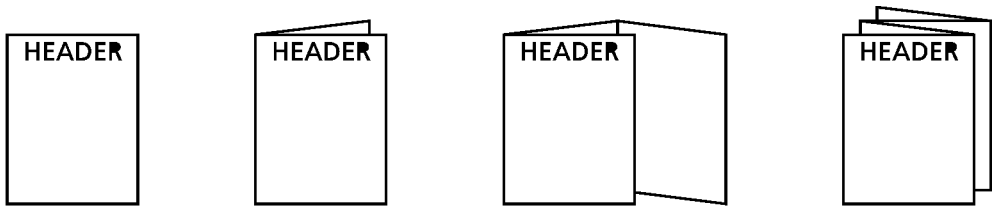
Revisions

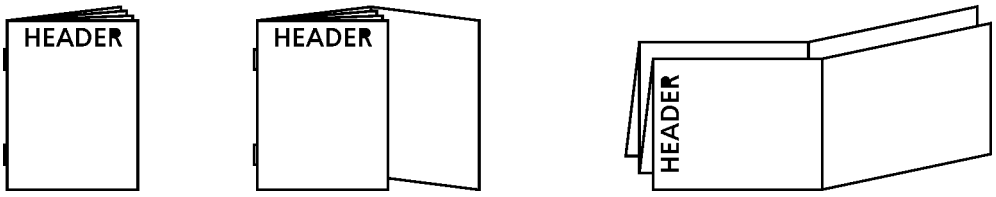
Rev from	Rev to	ECO #
0307	**2009/11**	**5191-09**

Notes:

1. BD Cat. Number 245128
2. Blank (Sheet) Size : Length: 9 1/2" Width: 12"
   Number of Pages: 36 Number of Sheets: 9
   Page Size: Length 9 1/2" Width 6" Final Folded Size: 3 1/4" x 6"
3. Style (see illustrations below): # 5



#1 #2 #3 #4



#5 #6 #7

4. See Specification Control Number N/A for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides ☒ Yes ☐ No
   No. of Colors: 1 PMS# Black
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design Date Proofer Date Checked By Date Part Number: L005486JAA	COMPANY CONFIDENTAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
	Category and Description Package Insert, BACTEC MGIT 960 PZA Kit	Sheet: 1 of 37 Scale: N/A	A

BD BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit

For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*

English:	pages	1 – 5	Italiano:	pagine	16 – 20
Français :	pages	6 – 10	Português:	páginas	21 – 25
Deutsch:	Seiten	11 – 15	Español:	páginas	26 – 30

L005486JAA
2009/11

Pokyny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviseletétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Inštrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкзии. / Contactaţi reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucţiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжетесь с местным представителем компании BD. / Өзіңіздің жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

INTENDED USE

The **BACTEC™ MGIT™** 960 PZA Kit is a rapid qualitative procedure for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, from culture, to pyrazinamide (PZA). The **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit is used with the **BACTEC MGIT** System.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antimycobacterial susceptibility testing is valuable in the proper treatment of patients with tuberculosis. The treatment of tuberculosis is commonly through a multiple drug regimen that includes the antimycobacterial drug pyrazinamide. It is important that the antimycobacterial drugs prescribed show appropriate activity against *Mycobacterium tuberculosis*, i.e., susceptibility of the isolate to the drug.

Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) has recently become a serious public health problem.[1] Resistance to any of the primary drugs, including pyrazinamide, makes the disease more difficult and expensive to treat. The rapid detection of these resistant isolates is critical to effective patient management.

Two methods have been widely used for antimycobacterial susceptibility testing. The first method, known as the Method of Proportion,[2] uses Middlebrook and Cohn 7H10 Agar. It compares colony counts on drug-containing and drug-free media. The testing for pyrazinamide requires some modification from the general methods because the drug is active *in vitro* only at lower pH values.[3] A modification to the method of proportion method was developed using a 7H10 agar medium at pH 5.5, with a drug concentration of 25 – 50 µg/mL.[4] A limitation of the method is that at a pH of 5.5, many isolates of *M. tuberculosis* either fail to grow or grow poorly. Agar-based methods such as the agar proportion method have not proven to be satisfactory for PZA susceptibility testing because of the failure of many isolates to grow when the agar has been acidified for the PZA test.

The second method, known as the **BACTEC** 460TB radiometric susceptibility method,[5] is based on the production of radioactive ^{14}C-labeled carbon dioxide by the growing mycobacteria, manifested by a Growth Index increase in the system. A modification to the **BACTEC** 460TB susceptibility method was developed using a modified 7H12 radiometric medium, **BACTEC** PZA Test Medium, with a reduced pH of 6.0.[6] At this pH, PZA activity against mycobacteria can be determined without inhibiting the growth of most *M. tuberculosis* isolates. The **BACTEC** 460TB PZA susceptibility test uses a pyrazinamide drug concentration of 100 µg/mL. Susceptibility testing in the **BACTEC** 460TB System has proven to be satisfactory and is presently considered the reference method for PZA susceptibility testing. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) recommends the **BACTEC** 460TB method for PZA susceptibility testing.[2]

Use of the **BACTEC MGIT** instrument in combination with the **BACTEC MGIT** 960 PZA kit is a non-radiometric method of determining antimycobacterial susceptibility to PZA. The **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit has been developed to allow susceptibility testing at a pyrazinamide concentration of 100 µg/mL. This concentration correlates with the concentration used in the **BACTEC** 460TB System.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

BACTEC MGIT 960 PZA Medium is a tube containing a modified Middlebrook 7H9 Broth, which supports the growth and detection of mycobacteria at a reduced pH of 5.9. The **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium tube contains a fluorescent compound embedded in silicone on the bottom of a 16 x 100 mm round-bottom tube. The fluorescent compound is sensitive to the presence of oxygen dissolved in the broth. The initial concentration of dissolved oxygen quenches the emission from the compound, and little fluorescence can be detected. Later, actively growing and respiring microorganisms consume the oxygen, which allows the compound to fluoresce.

The **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit is a 4 – 21 day qualitative test. The test is based on growth of the *M. tuberculosis* isolate in a drug-containing tube compared to a drug-free tube (Growth Control). The **BACTEC MGIT** instrument monitors tubes for increased fluorescence. Analysis of fluorescence in the drug-containing tube compared to the fluorescence of the Growth Control tube is used by the instrument to determine susceptibility results.

The **BACTEC MGIT** instrument automatically interprets these results and reports a susceptible or resistant result.

REAGENTS

The **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium tube contains 110 µL of fluorescent indicator and 7 mL of PZA broth. The indicator contains Tris 4,7 - diphenyl-1, 10 phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate in a silicone rubber base. The tubes are capped with a polypropylene cap. The pH is adjusted to 5.9.

Approximate Formula* Per L of Purified Water:

Modified Middlebrook 7H9 broth .....5.9 g
Casein peptone .....1.25 g

BACTEC MGIT 960 PZA Kit contains two lyophilized vials of pyrazinamide and six vials of PZA Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Pyrazinamide .....20,000 µg

BACTEC MGIT 960 PZA Supplement contains 15 mL of enrichment

Approximate Formula* Per L Purified Water:

Bovine albumin .....50.0 g
Dextrose .....20.0 g
Polyoxyethylene stearate (POES) .....1.1 g
Catalase .....0.03 g
Oleic Acid .....0.1 g

**Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.*

Storage and reconstitution of reagents:

BACTEC MGIT 960 PZA Medium - On receipt, store at 2 – 25°C. DO NOT FREEZE. Broth should appear clear and colorless. Do not use if turbid. Minimize exposure to light. Tubes stored as labeled prior to use, may be inoculated up to the expiration date.

BACTEC MGIT 960 PZA Drug vials - On receipt, store the lyophilized drug vials at 2 – 8°C. Once reconstituted, the antibiotic solution may be frozen and stored at -20°C or colder up to six months, not to exceed the original expiration date. Once thawed, use immediately. Discard unused portions.

BACTEC MGIT 960 PZA Supplement - On receipt, store in the dark at 2 – 8°C. Avoid freezing or overheating. Open and use prior to the expiration date. Minimize exposure to light.

Directions For Use:

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 PZA lyophilized drug vial with **2.5 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 8000 µg/mL.

WARNINGS AND PRECAUTIONS: For *in vitro* Diagnostic Use.

POTENTIALLY INFECTIOUS TEST SPECIMEN: Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"[7-10] and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Working with *M. tuberculosis* growth in culture requires Biosafety Level (BSL) 3 practices, containment equipment and facilities.

Read and follow directions contained in all appropriate package inserts including the **BBL™ MGIT** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube.

Prior to use, the user should examine the tubes and vials for evidence of contamination or damage. Discard any tubes or vials if they appear unsuitable. Dropped tubes should be examined carefully. If damage is seen, the tube should be discarded.

In the event of tube breakage: 1) Close the instrument drawers; 2) Turn off the instrument; 3) Vacate the area immediately; 4) Consult your facility/CDC guidelines. An inoculated leaking or broken tube may produce an aerosol of mycobacteria; appropriate handling should be observed.

Autoclave all inoculated **MGIT** tubes prior to disposal.

INOCULUM PREPARATION

All preparations detailed below must be from pure cultures of *M. tuberculosis*. The laboratory should confirm, by appropriate identification techniques, that the isolate to be tested is a pure culture of *M. tuberculosis*.

Inoculum can be prepared from solid media or from a positive **BACTEC MGIT** 7 mL tube. In addition, cultures grown in liquid and on solid media can be used to prepare a seed **MGIT** tube, which can then be used to prepare the inoculum. Each of these options is described below.

Preparation of the Inoculum from Solid Media:

NOTE: It is important to prepare the inoculum according to the following instructions to obtain the appropriate organism concentration for the susceptibility test.

1. Add 4 mL of **BBL** Middlebrook 7H9 Broth (or **BBL MGIT** broth) to a 16.5 x 128 mm sterile tube with cap containing 8 – 10 glass beads.
2. Scrape with a sterile loop as many colonies as possible from growth no more than fourteen days old, trying not to remove any solid medium. Suspend the colonies in the Middlebrook 7H9 Broth.
3. Vortex the suspension for 2 – 3 minutes to break up the larger clumps. The suspension should exceed a 1.0 McFarland standard in turbidity.
4. Let the suspension sit for 20 minutes without disturbing.
5. Transfer the supernatant fluid to another 16.5 x 128 mm sterile tube with cap (avoid transferring any of the sediment) and let sit for another 15 minutes.
6. Transfer the supernatant fluid (it should be smooth, free of any clumps) to a third 16.5 x 128 mm sterile tube. **NOTE**: The organism suspension should be greater than a 0.5 McFarland standard at this step.
7. Adjust the suspension to a 0.5 McFarland standard by visual comparison to a 0.5 McFarland turbidity standard. Do not adjust below a 0.5 McFarland standard.
8. Dilute 1 mL of the adjusted suspension in 4 mL of sterile saline (1:5 dilution). Use this as the AST inoculum and proceed to "Inoculation Procedure for **BACTEC MGIT** 960 PZA Susceptibility Test."

Preparation of the Inoculum from a Positive BACTEC MGIT 7 mL Tube:

1. The first day of an instrument positive **BACTEC MGIT** tube is considered Day 0.
2. For the preparation of the test inoculum, a positive 7 mL **MGIT** tube should be used the day after it first becomes positive on the **BACTEC MGIT** instrument (Day 1), up to and including the fifth day (Day 5) after instrument positivity. A tube which has been positive longer than five days should be subcultured to a fresh 7 mL **MGIT** tube containing **BACTEC MGIT** Growth Supplement and tested on the **BACTEC MGIT** instrument until positive, and used from one to five days following positivity. See "Preparation of a Seed **MGIT** Tube from Liquid Media."
3. If the tube is a Day 1 or Day 2 positive, no dilution is required. Use this as the AST inoculum and proceed to "Inoculation Procedure for **BACTEC MGIT** 960 PZA Susceptibility Test."
4. If the tube is a Day 3, Day 4, or Day 5 positive, then dilute 1 mL of the positive broth in 4 mL of sterile saline (1:5 dilution). Mix tube thoroughly. Use this as the AST inoculum and proceed to "Inoculation Procedure for **BACTEC MGIT** 960 PZA Susceptibility Test."

Preparation of a Seed MGIT Tube from Liquid Media

1. Mix the tube by inversion or vortexing.
2. Make a 1:100 dilution by adding 0.1 mL of the culture into 10 mL of **BBL** Middlebrook 7H9 Broth or **BBL MGIT** Broth. Mix well.
3. Add 0.5 mL of this suspension into a 7 mL **MGIT** tube supplemented with 0.8 mL of **BACTEC MGIT** Growth Supplement.
4. Cap tightly and gently mix by inverting 2 – 3 times.
5. Enter the tube into a **BACTEC MGIT** instrument and test until positive.

   NOTE: Time to positivity **must** be ≥ 4 days for use as AST inoculum. If tube becomes positive in < 4 days, return to step 1 and prepare a new seed tube.
6. This tube may now be used from one to five days following positivity. Proceed to "Preparation of the Inoculum from a Positive **BACTEC MGIT** 7 mL Tube" above.

Preparation of a Seed MGIT Tube from Solid Media

1. Using a sterile loop, scrape growth from a slant and add to a 7 mL **MGIT** tube supplemented with 0.8 mL of **BACTEC MGIT** Growth Supplement.
2. Cap tightly and gently mix by inverting 2 – 3 times.
3. Enter the tube into a **BACTEC MGIT** instrument and test until positive.

   NOTE: Time to positivity **must** be ≥ 4 days for use as AST inoculum. If tube becomes positive in < 4 days, return to step 1 and prepare a new seed tube.
4. This tube may now be used from one to five days following positivity. Proceed to "Preparation of the Inoculum from a Positive **BACTEC MGIT** 7 mL Tube" above.

PROCEDURE

Materials Provided: BACTEC MGIT 960 PZA Kit containing two vials each lyophilized drug and six vials of PZA Supplement (approximately 50 tests per kit).

Materials Required But Not Provided: BACTEC MGIT 960 PZA Medium (25 tubes per carton), ancillary culture media, reagents, quality control organisms and laboratory equipment as required for this procedure.

Inoculation Procedure for BACTEC MGIT 960 PZA Susceptibility Test:

Important considerations when preparing the PZA AST Set are the proper reconstitution of the lyophilized drug, use of pure culture and the proper dilution of the organism for the Growth Control and PZA tube. It is important to add drug only to the corresponding **MGIT** tube labeled "PZA." Use only the **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement supplied with the kit and **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium tubes when performing the PZA AST set.

1. Label two 7 mL **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium tubes for each test isolate. Label one as GC (Growth Control), one as PZA. Place the tubes in the correct sequence in the two tube AST set carrier (see **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual).
2. Aseptically add 0.8 mL of **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement to each tube.
3. Using a micropipet, aseptically pipet 100 µL of the 8000 µg/mL **BACTEC MGIT** 960 PZA drug solution to the appropriately labeled **MGIT** PZA tube. No PZA drug solution should be added to the appropriately labeled **MGIT** GC tube.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution*	Volume Added to MGIT Tubes for Test	Final Concentration in MGIT Tubes
MGIT PZA	8000 µg/mL	100 µL	100 µg/mL*

*PZA must be reconstituted using **2.5 mL** sterile/deionized water to achieve the concentration indicated.

4. **Growth Control tube preparation and inoculation:** Aseptically pipet 0.5 mL of the AST inoculum (see "INOCULUM PREPARATION") into 4.5 mL of sterile saline to prepare the **1:10** Growth Control suspension. Mix the Growth Control suspension thoroughly. Inoculate 0.5 mL of the **1:10** Growth Control suspension into the **MGIT** tube labeled "GC."

   NOTE: It is important to use an appropriately prepared **1:10** dilution for the "GC" tube to ensure accurate AST results and avoid PZA AST set errors.
5. **Drug-containing tube inoculation:** Aseptically pipet 0.5 mL of the AST inoculum (see "INOCULUM PREPARATION") into the **MGIT** tube labeled "PZA."
6. Tightly recap the tubes. Mix tubes thoroughly by gentle inversion three to four times.
7. Enter the PZA set into the **BACTEC MGIT** instrument using the AST set entry feature (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual). Ensure that the Growth Control tube is in the first left tube position. Select PZA as the drug in the 2 tube AST set carrier definition when performing the AST set entry.
8. Streak 0.1 mL of the organism suspension to a **Trypticase™** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) plate. Enclose in a plastic bag. Incubate at 35 – 37°C.
9. Check the blood agar plate at 48 hours for bacterial contamination. If the blood agar plate shows no growth, then allow PZA testing to proceed. If the blood agar plate shows growth, discard the PZA set (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual) and repeat testing with a pure culture of *Mycobacterium tuberculosis*.

User Quality Control: Upon receipt of a new shipment or lot number of **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit vials or **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium, it is recommended that the control organism shown below be tested. The control organism should be a pure culture and the culture should be prepared according to "INOCULUM PREPARATION" instructions.

The quality control (QC) AST Set should be prepared according to the "Inoculation Procedure for **BACTEC MGIT** 960 PZA Susceptiblity Test" instructions. Important considerations when preparing the QC AST Set are the proper reconstitution of the lyophilized drug, use of pure culture and the proper dilution of the QC organism for the Growth Control and PZA tubes. It is important to add drug only to the corresponding **MGIT** tube labeled "PZA."

The same control organism should be run as batch QC once each week when susceptibility testing is performed. Observation of the proper results, as shown below, within 4 – 20 days indicates that the **BACTEC MGIT** 960 PZA reagents are ready for use in testing patient isolates.

If the proper results are not observed, do not report patient results. Repeat QC and any patient isolates affected by the initial QC failure. If the repeat QC does not perform as expected, do not report patient results. Do not use the product until you have contacted Technical Services at (800) 638-8663 (United States Only).

Strains	GC	MGIT PZA
M. tuberculosis ATCC™ 27294	Positive	Susceptible

During the external evaluation of the **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit the average time to result for the control organism was seven days with a range of four to eleven days. The most common causes of QC failures during the external evaluation were over-inoculated PZA Sets and contaminated QC cultures.

RESULTS

The **BACTEC MGIT** instrument will monitor AST sets until a susceptible or resistant determination is made. Once the set testing is completed, the results are reported by the **BACTEC MGIT** instrument (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual). The **BACTEC MGIT** instrument will report an AST Set result as an Error ("X"), no susceptibility interpretation, when certain conditions occur that may affect the test results. Conditions that may result in an Error ("X") result are described in Section 7 – Troubleshooting of the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual.

It is important to include the test method, drug name and concentration when reporting results. The Pulmonary and/or Infectious Disease specialist in TB control should be consulted concerning the appropriate therapeutic regimen and dosages.

Mono-resistance to pyrazinamide is uncommon, therefore in the event of unexpected resistant results, verify purity and identification of the isolate tested as *M. tuberculosis*. Guidelines for mycobacterial purity checks can be found in the CLSI M24 standard.[2]

BACTEC MGIT 960 PZA result reporting

Drug (concentration)	BACTEC MGIT System result	Recommended Report	Action
PZA (100 µg/mL)	Susceptible	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System [PZA/100 µg/mL] and result is susceptible.	No action.
	Resistant	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System [PZA/100 µg/mL] and result is resistant.	If isolate is mono-resistant to PZA, confirm that isolate tested is a pure culture of *Mycobacterium tuberculosis*.
	Error "X"	No report.	Repeat test.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test does not interpret the degree of susceptibility of the isolate being tested. Results are reported as either susceptible or resistant.

The **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test can only be performed using a **BACTEC MGIT** instrument. The PZA Sets cannot be read manually.

Use only pure cultures of *M. tuberculosis.* Cultures that are contaminated or that may contain multiple species of mycobacteria may give erroneous results and should not be tested. Direct testing from clinical specimens is not recommended.

Suspensions made from solid media must be allowed to settle for the prescribed times prior to standardization. Inoculum preparations made from solid media should be visually compared to a 0.5 McFarland turbidity standard; failure to do so may give inaccurate results or cause an AST Set error.

Failure to use the 1:5 dilution of the organism suspension, when indicated, to inoculate the drug containing tubes may give inaccurate results.

Failure to use a 1:10 dilution of the organism suspension for the inoculation of the Growth Control tube may give inaccurate results or cause an AST Set error.

Failure to reconstitute the PZA drug with the appropriate volume of sterile distilled / deionized water may give inaccurate results.

Thorough mixing of inoculated tubes is important. Failure to mix the tubes adequately may lead to false resistant results.

Failure to load the tubes of the AST Set into the AST Set Carrier in the proper sequence may give inaccurate results. Failure to select the appropriate set carrier drug definition may result in invalid or inaccurate results.

Failure to load the AST Set into the instrument correctly will result in an anonymous condition that must be resolved within eight hours. If condition is not resolved within eight hours, the AST Set must be discarded and set up again.

Failure to use the **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement in the PZA AST set may give inaccurate results. DO NOT add **BACTEC MGIT** 960 SIRE Supplement or **BACTEC MGIT** Growth Supplement to the PZA AST set.

Failure to use **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium for the PZA AST set may give inaccurate results. DO NOT substitute **BBL MGIT** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tubes for **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium.

EXPECTED VALUES

A total of 118 clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested with the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test at four geographically diverse sites. The testing included both fresh clinical and subcultured isolates from both liquid and solid culture sources. A total of 228 PZA susceptibility tests (liquid and solid) were performed.

During the external evaluation of the **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit, there were nine PZA tests from clinical isolates that required repeat testing due to contamination (six isolates) or overinoculation/procedural errors (three isolates).

The average time-to-result for the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test is seven days with a range from four to seventeen days. The data are shown in Figure 1 at end of insert.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Studies

Liquid and Solid Media AST Inoculum Ranges:

Liquid media - The recommended procedure for preparing a PZA Set from a positive **MGIT** 7 mL tube uses a direct inoculum on Day 1 and Day 2 post-positivity and a dilute (1:5) inoculum on Day 3 to Day 5 post-positivity. Internal studies show that inocula prepared from a Day 1 to Day 5 positive **MGIT** 7 mL tube range between 2.0×10^4 to 7.5×10^6 CFU/mL.

Solid media - The recommended procedure for preparing a PZA Set from growth on solid media (up to 14 days after first visible growth is seen) uses a 1:5 dilution of an organism suspension equivalent to a 0.5 McFarland Standard. Internal studies show that inocula prepared from solid medium culture range between 2.1×10^5 to 3.9×10^6 CFU/mL.

Lot Reproducibility:

Lot reproducibility was evaluated using twenty-five *M. tuberculosis* strains (including three ATCC™ strains). Each strain was tested in triplicate with the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test. Each replicate represented a separate test condition differentiated by lot of PZA drug, PZA supplement and PZA medium used (three lots each).

Observed results were compared to the expected results. The overall reproducibility for the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test is 96.8%.

CDC Challenge Panel Testing:

The performance of the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test was evaluated using a panel of challenge strains obtained from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA. The panel consisted of nine strains of *M. tuberculosis* with known susceptibility patterns (using **BACTEC** 460TB). The panel was tested in triplicate with the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test. The **BACTEC MGIT** 960 PZA results were compared to the CDC expected results. The overall agreement with CDC expected results for the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test is 98.7%.

Clinical Evaluation

The **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test was evaluated at four geographically diverse clinical sites composed of regional reference centers and university hospital-based laboratories, including two ex-US sites. The **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test was compared to the **BACTEC** 460TB PZA susceptibility test method.

Reproducibility Testing:

The reproducibility of the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test was evaluated at the clinical sites using a panel of five qualified strains. The **BACTEC MGIT** 960 PZA test results were compared to the expected results. The overall reproducibility for the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test is 94%.

CDC Challenge Panel Testing:

The performance of the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test was evaluated at each of the four clinical sites using a panel of challenge strains obtained from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA. The panel consisted of nine strains of *M. tuberculosis* with known susceptibility patterns (using **BACTEC** 460TB). Of the thirty-six PZA results collected with the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test, thirty-three agreed with the CDC expected results. The calculated percent agreement to the CDC expected results for the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test is 91.7%.

Clinical Isolate Testing:

A total of 118 clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested with the **BACTEC MGIT** 960 PZA susceptibility test and the **BACTEC** 460TB PZA susceptibility test. This included testing of both fresh clinical and subcultured isolates from both liquid and solid culture sources. This generated a total of 228 test results.

Table 1 presents the results from clinical isolate testing for PZA drug at 100 µg/mL from liquid source cultures, from solid source cultures and both source cultures combined.

Table 1: Clinical Isolate Results – BACTEC MGIT 960 PZA susceptibility test compared to BACTEC 460TB susceptibility test

		BACTEC 460TB System		BACTEC MGIT 960 System			
		Expected PZA Results		Susceptible Results		Resistant Results	
Source	# Tests	S	R	# agree	Category agreement % (95% CI)	# agree	Category agreement % (95% CI)
LIQUID	112	89	23	88	98.9% (93.9 – 100)	22	95.7% (78.1 – 99.9)
SOLID	113*	90	23	88	97.8% (92.2 – 99.7)	20	87.0% (66.4 – 97.2)
ALL	225*	179	46	176	98.3% (95.2 – 99.7)	42	91.3% (79.2 – 97.6)

*Three **BACTEC** 460TB borderline results are not included in this table.

All isolates with discordant **BACTEC MGIT** 960 PZA test results were tested using the **BACTEC** 460TB PZA susceptibility test at two independent sites. Discordant results were those strains where the **BACTEC MGIT** 960 PZA test result differed from the **BACTEC** 460TB PZA test result. Borderline results are not included in the performance calculations for the **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit.

Of the four discordant PZA susceptible (S-**BACTEC MGIT** 960, R-**BACTEC** 460TB) isolates tested, one had susceptible results from both independent sites and the other three had resistant results from both independent sites. Of the three discordant PZA resistant (R-**BACTEC MGIT** 960, S-**BACTEC** 460TB) isolates tested, all isolates had susceptible results from both independent sites.

Two of the three **BACTEC** 460TB borderline PZA results (S-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) had susceptible results from both independent sites. One of the three **BACTEC** 460TB borderline PZA results (R-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) had one independent site determine a susceptible result. The other independent site determined a borderline result.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
245128	**BACTEC™ MGIT™** 960 PZA Kit, carton of 2 lyophilized vials and six PZA Supplements.
245115	**BACTEC™ MGIT™** 960 PZA Medium, carton of 25 tubes.

REFERENCES

1. Barenfanger, J. 1993. Making your lab safe against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Newsl. *15*: 76-80.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. Approved Standard M24-A. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. CLSI, Wayne, Pa.
3. Butler, W.R. and Kilburn, 1982. Improved method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J. Clin.Microbiol. *16*:1106-1109.
4. Heifets, L.B. and Iseman, M.D. 1985. Radiometric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide in 7H12 broth. J.Clin.Microbiol. *21*:200-204.
5. BD Diagnostic Systems. **BACTEC™** 460TB System Product and Procedure Manual.
6. Salfinger, M. et al. 1989. Rapid radiometric method for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Res. Microbiol. *140*:301-309.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
8. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. *17*:53-80.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.

BD Trousse BACTEC MGIT 960 PZA

Pour le test de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antimycobactériens

Français

APPLICATION

La trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA est un test de sensibilité qualitatif rapide de *Mycobacterium tuberculosis*, en culture, au pyrazinamide (PZA). La trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA est utilisée avec le système **BACTEC MGIT**.

RESUME ET EXPLICATION

Le test de sensibilité aux antimycobactériens est précieux pour un traitement approprié des patients atteints de tuberculose. Le traitement de la tuberculose consiste en général à administrer un ensemble de plusieurs antibiotiques dont un antimycobactérien, le pyrazinamide. Il importe que les antimycobactériens prescrits démontrent une activité spécifique contre *Mycobacterium tuberculosis*, vérifiée par la sensibilité de l'isolat à ces antibiotiques.

Des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à plusieurs médicaments (MDR-TB) créent depuis peu un problème de santé publique sérieux.[1] La résistance à l'un des antibiotiques primaires y compris le pyrazinamide, rend le traitement de la maladie plus difficile et plus coûteux. La détection rapide de ces isolats résistants est essentielle pour une prise en charge efficace des patients.

Deux méthodes ont été largement utilisées pour tester la sensibilité aux antimycobactériens. La première méthode, dite Méthode des Proportions,[2] utilise la gélose de Middlebrook et Cohn 7H10. Elle compare le nombre de colonies sur gélose contenant l'antibiotique à celui obtenu sur milieu sans antibiotique. Le test pour le pyrazinamide requiert quelques modifications de la méthode générale parce que cet antibiotique n'est actif *in vitro* qu'aux pH plus faibles.[3] Une modification de la méthode des proportions a été mise au point en utilisant un milieu gélosé 7H10 à pH 5,5 avec une teneur en antimycobactérien de 25 à 50 µg/mL.[4] Le problème de cette méthode est qu'à pH 5,5, de nombreux isolats de *M. tuberculosis* ne se développent pas du tout ou se développent très peu. Les méthodes sur gélose telles que la méthode des proportions n'ont pas donné satisfaction dans le cas du test de sensibilité au PZA en raison de l'incapacité de nombreux isolats à se développer sur une gélose qui a été acidifiée spécialement pour ce test de sensibilité au PZA.

La seconde méthode ou méthode de respirométrie radiométrique **BACTEC** 460TB,[5] utilise la production de dioxyde de carbone radioactif marqué au ^{14}C par le développement mycobactérien, qui se traduit par une augmentation de l'indice de croissance dans le système. Une modification de la méthode de sensibilité **BACTEC** 460TB a été mise au point en utilisant un milieu radiométrique 7H12 modifié, le milieu de test **BACTEC** PZA, avec un pH réduit de 6,0.[6] À ce pH, l'activité PZA contre les mycobactéries peut être déterminée sans inhiber la croissance de la plupart des isolats de *M. tuberculosis*. Le test de sensibilité **BACTEC** 460TB PZA utilise une concentration de pyrazinamide de 100 µg/mL. Les tests de sensibilité dans le système **BACTEC** 460TB se sont avérés satisfaisants et sont actuellement considérés comme méthode de référence pour tester la sensibilité au PZA. Le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, anciennement NCCLS, Commission de normes de laboratoires d'analyses médicales aux Etats-Unis) continue à recommander l'emploi de deux concentrations pour tester la sensibilité aux principaux antibiotiques, exceptée la rifampicine, par la méthode des proportions (MOP).[2]

L'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT** associée à la trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA assure une méthode non-radiométrique pour déterminer la sensibilité antimycobactérienne au PZA. La trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA a été mise au point de façon à pouvoir effectuer des tests de sensibilité à une concentration en pyrazinamide de 100 µg/mL. Cette concentration correspond à celle utilisée dans le système **BACTEC** 460TB.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA est un tube contenant un bouillon modifié de Middlebrook 7H9, qui assure la croissance et la détection de mycobactéries à un pH réduit de 5,9. Le tube de milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA contient un composé fluorescent incorporé à la silicone présente au fond du tube de 16 x 100 mm à fond rond. Le composé fluorescent est sensible à la présence d'oxygène dissous dans le bouillon. La concentration d'oxygène dissous initiale éteint la fluorescence du composé et l'émission détectable est très faible. Par la suite, la croissance et la respiration des microorganismes consomment l'oxygène du milieu et permettent à la fluorescence de s'exprimer.

La trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA est un test qualitatif de 4 à 21 jours. Le test est basé sur une comparaison de la croissance d'un isolat de *M. tuberculosis* dans un tube contenant un antibiotique avec celle obtenue dans un tube sans antibiotique (Contrôle de croissance). L'instrument **BACTEC MGIT** contrôle les tubes pour déceler toute augmentation de fluorescence. L'instrument compare la fluorescence du tube contenant l'antibiotique à celle du tube Contrôle de croissance pour établir les résultats de sensibilité.

L'instrument **BACTEC MGIT** interprète automatiquement ces résultats et donne un résultat de sensibilité ou de résistance.

REACTIFS

Le tube de milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA contient 110 µL d'un indicateur fluorescent et 7 mL de bouillon pour PZA. L'indicateur contient du Tris 4,7-diphényl-1,10 phénanthroline ruthénium chlorure pentahydraté dans une base de silicone élastomère. Les tubes sont bouchés avec des capuchons en polypropylène. Le pH est ajusté à 5,9.

Formule * approximative par L d'eau purifiée :

Bouillon modifié de Middlebrook 7H9 . . . . . .5,9 g
Peptone caséine . . . . . .1,25 g

La trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA contient deux flacons lyophilisés de pyrazinamide et six flacons de supplément PZA.

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Pyrazinamide . . . . . .20.000 µg

Le supplément **BACTEC MGIT** 960 PZA contient 15 mL de complément d'enrichissement.

Formule * approximative par L d'eau purifiée :

Albumine bovine . . . . . .50,0 g
Dextrose . . . . . .20,0 g
Stéarate de polyoxyéthylène (POES) . . .1,1 g
Catalase . . . . . .0,03 g
Acide oléique . . . . . .0,1 g

**Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.*

Conservation et reconstitution des réactifs :

Milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA – Dès réception, conserver entre 2 et 25 °C. NE PAS CONGELER. Le bouillon doit être limpide et incolore. Ne pas l'utiliser s'il est trouble. Maintenir à l'abri de la lumière. Les tubes conservés comme indiqué sur l'étiquette peuvent être inoculés jusqu'à la date de péremption.

Flacons d'antimycobactérien **BACTEC MGIT** 960 PZA – Dès réception, conserver les flacons d'antimycobactérien lyophilisé à une température comprise entre 2 à 8 °C. Une fois reconstituée, la solution antibiotique peut être congelée et conservée à -20 °C ou à une température inférieure jusqu'à six mois et sans dépasser la date de péremption originelle. Une fois décongelées, les solutions doivent être utilisées immédiatement. Jeter les portions non utilisées.

Supplément **BACTEC MGIT** 960 PZA – Dès réception, conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C. Éviter de le congeler ou de le surchauffer. Ouvrir et utiliser avant la date de péremption. Maintenir à l'abri de la lumière.

Directives d'emploi :

Reconstituer chaque flacon d'antimycobactérien **BACTEC MGIT** 960 PZA lyophilisé avec **2,5** mL d'eau stérile distillée ou désionisée pour faire une solution mère de 8000 µg/mL.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS : Réservé au diagnostic *in vitro*.

ÉCHANTILLON CLINIQUE POTENTIELLEMENT INFECTIEUX : Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »[7-10] et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

La manipulation de *M. tuberculosis* en culture nécessite des pratiques de sécurité biologique de niveau 3 (BSL) ainsi que les appareils et installations de confinement correspondants.

Lire et suivre les instructions contenues dans toutes les notices d'emploi concernées, y compris la notice des tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** 7 mL.

Avant utilisation, il convient d'examiner les tubes et les flacons pour vérifier l'absence de contamination ou de détérioration. Jeter tout tube ou flacon apparaissant suspect. Examiner avec soin les tubes tombés à terre. Éliminer les tubes visiblement endommagés.

En cas de bris de tube : 1) Fermer les tiroirs de l'instrument ; 2) Éteindre l'instrument ; 3) Évacuer les lieux immédiatement ; 4) Se reporter aux directives de l'établissement/du centre épidémiologique (CDC). Un tube ensemencé brisé ou présentant une fuite peut produire un aérosol de mycobactéries ; manipuler impérativement le tube comme il convient.

Stériliser à l'autoclave tous les tubes **MGIT** avant de les jeter.

PREPARATION DE L'INOCULUM

Toutes les préparations détaillées ci-dessous doivent provenir de cultures pures de *M. tuberculosis*. Le laboratoire doit confirmer, par techniques d'identification appropriées, que l'isolat à tester est une culture pure de *M. tuberculosis.*

L'inoculum peut être préparé à partir de milieux solides ou d'un tube **BACTEC MGIT** 7 mL positif. De plus, des cultures sur milieux liquides ou solides peuvent être utilisées pour préparer un tube **MGIT** d'ensemencement qui peut ensuite servir à la préparation de l'inoculum. Chacune de ces options est décrite ci-après.

Préparation de l'inoculum à partir d'un milieu solide :

REMARQUE : Il importe de préparer l'inoculum conformément aux instructions suivantes pour obtenir la concentration de microorganismes appropriée pour le test de sensibilité.

1. Ajouter 4 mL de bouillon **BBL** Middlebrook 7H9 (ou bouillon **BBL MGIT**) à un tube stérile de 16,5 x 128 mm avec capuchon, contenant 8 à 10 billes de verre.
2. À l'aide d'une anse bactériologique stérile, racler la surface d'une culture de quatorze jours au maximum afin de récolter le plus de colonies possible tout en veillant à ne prélever aucun milieu solide. Suspendre les colonies dans le Bouillon Middlebrook 7H9.
3. Vortexer la suspension pendant 2 à 3 minutes afin de briser les gros agrégats. La turbidité de la suspension doit excéder le standard McFarland 1,0.
4. Laisser reposer complètement la suspension pendant 20 minutes.
5. Transférer le surnageant liquide dans un autre tube stérile de 16,5 x 128 mm avec capuchon (éviter de transférer le sédiment) et laisser reposer à nouveau pendant 15 minutes.
6. Transférer le surnageant liquide (qui doit être fluide et exempt de tout agrégat) dans un troisième tube stérile de 16,5 x 128 mm. **REMARQUE :** À ce stade, la turbidité de la suspension de microorganismes devrait être supérieure au standard McFarland 0,5.
7. Ajuster la suspension à une turbidité équivalente au standard McFarland 0,5 en la comparant visuellement à un standard de turbidité McFarland 0,5. La turbidité ne doit pas être inférieure au standard McFarland 0,5.
8. Diluer 1 mL de la suspension ajustée dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5). Utiliser cela comme inoculum AST et passer à la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ».

Préparation de l'inoculum à partir d'un tube BACTEC MGIT 7 mL positif :

1. Le premier jour d'un tube **BACTEC MGIT** positif dans l'instrument est considéré comme Jour 0.
2. Pour la préparation de l'inoculum pour le test, un tube **MGIT** 7 mL positif doit être utilisé le jour suivant celui où il a été déterminé comme positif par l'instrument **BACTEC MGIT** (Jour 1) et au plus dans les cinq jours (Jour 5) suivant l'apparition de la positivité. Un tube positif depuis plus de cinq jours doit être repiqué dans un nouveau tube **MGIT** 7 mL contenant le supplément de croissance **BACTEC MGIT** et testé sur l'instrument **BACTEC MGIT** jusqu'à ce qu'il soit déterminé comme positif, puis utilisé dans les cinq jours qui suivent. Se reporter à « Préparation d'un tube **MGIT** d'ensemencement à partir de milieux liquides ».
3. Si le tube est positif du Jour 1 ou du Jour 2, aucune dilution n'est requise. Utiliser cela comme inoculum AST et passer à la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ».
4. Si le tube est positif du Jour 3, du Jour 4, ou du Jour 5, diluer 1 mL du bouillon positif dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5). Bien mélanger le contenu du tube. Utiliser cela comme inoculum AST et passer à la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ».

Préparation d'un tube MGIT d'ensemencement à partir de milieux liquides

1. Bien mélanger le contenu du tube en l'inversant ou le passant au vortex.
2. Faire une dilution à 1:100 en ajoutant 0,1 mL de culture dans 10 mL de bouillon **BBL** Middlebrook 7H9 Broth ou **BBL MGIT** Broth. Bien mélanger.
3. Ajouter 0,5 mL de cette suspension dans un tube 7 mL **MGIT** additionné de 0,8 mL de supplément de croissance **BACTEC MGIT**.
4. Boucher hermétiquement et mélanger en inversant 2 à 3 fois.
5. Placer le tube dans un instrument **BACTEC MGIT** et tester jusqu'à obtenir un résultat positif.

   REMARQUE : Le délai pour obtenir un résultat positif **doit** être ≥ 4 jours pour pouvoir servir comme inoculum AST. Si le tube devient positif en < 4 jours, revenir à l'étape 1 et préparer un nouveau tube d'ensemencement.
6. Ce tube peut désormais être utilisé d'un à cinq jours après être devenu positif. Passer à la « Préparation de l'inoculum à partir d'un tube **BACTEC MGIT** 7 mL positif » décrite ci-dessus.

Préparation d'un tube MGIT d'ensemencement à partir de milieux solides

1. A l'aide d'une anse d'ensemencement stérile, prélever un peu de culture d'une culture inclinée et l'ajouter à un tube 7 mL **MGIT** additionné de 0,8 mL de supplément de croissance **BACTEC MGIT**.
2. Boucher hermétiquement et mélanger en inversant 2 à 3 fois.
3. Placer le tube dans un instrument **BACTEC MGIT** et tester jusqu'à obtenir un résultat positif.

   REMARQUE : Le délai pour obtenir un résultat positif **doit** être ≥ 4 jours pour pouvoir servir comme inoculum AST. Si le tube devient positif en < 4 jours, revenir à l'étape 1 et préparer un nouveau tube d'ensemencement.
4. Ce tube peut désormais être utilisé d'un à cinq jours après être devenu positif. Passer à la « Préparation de l'inoculum à partir d'un tube **BACTEC MGIT** 7 mL positif » décrite ci-dessus.

METHODE

Matériel fourni : La trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA contient deux flacons d'antimycobactérien lyophilisés et six flacons de supplément PZA (environ 50 tests par trousse).

Matériels requis mais non fournis : Milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA (25 tubes par carton), avec milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire nécessaires à la réalisation de cette méthode.

Méthode d'ensemencement pour le test BACTEC MGIT 960 de sensibilité au PZA :

Plusieurs considérations sont importantes pour la préparation du module AST PZA : la bonne reconstitution des antibiotiques lyophilisés, l'utilisation d'une culture pure et la dilution adéquate de la souche pour le tube PZA et Contrôle de croissance. Il est important de n'ajouter l'antibiotique que dans le tube **MGIT** correspondant étiqueté « PZA ». Utiliser uniquement le supplément **BACTEC MGIT** 960 PZA fourni avec la trousse et les tubes de milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA en effectuant le module AST PZA.

1. Étiqueter deux tubes de milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA 7 mL pour chaque isolat à tester. Étiqueter l'un des tubes GC (Contrôle de croissance) et l'autre tube PZA. Placer les tubes dans l'ordre approprié dans le support de portoir AST à deux tubes (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).
2. Ajouter stérilement 0,8 mL de supplément **BACTEC MGIT** 960 PZA à chaque tube.
3. À l'aide d'une micropipette, pipeter de manière aseptique 100 µL de la solution antimycobactérienne de **BACTEC MGIT** 960 PZA à 8000 µg/mL vers le tube **MGIT** PZA correctement identifié. Aucune solution antimycobactérienne ne doit être ajoutée au tube **MGIT** GC correctement identifié.

Antibiotique	Concentration d'antibiotique après reconstitution*	Volume ajouté aux tubes MGIT pour le test	Concentration finale dans les tubes MGIT
MGIT PZA	8000 µg/mL	100 µL	100 µg/mL*

*Le PZA doit être reconstitué avec **2,5** mL d'eau stérile/désionisée afin d'obtenir la concentration indiquée.

4. **Préparation et ensemencement du tube Contrôle de croissance :** Pipeter de manière aseptique 0,5 mL d'inoculum AST (cf. « PRÉPARATION DE L'INOCULUM ») dans 4,5 mL de sérum physiologique stérile afin de préparer une suspension au **1:10** du Contrôle de croissance. Mélanger soigneusement la solution du Contrôle de croissance. Inoculer 0,5 mL de la suspension au **1:10** du Contrôle de croissance dans le tube **MGIT** étiqueté « GC ».

   REMARQUE : Il est important d'utiliser une dilution au **1:10** correctement préparée pour le tube « GC » afin d'assurer des résultats AST précis et d'éviter les erreurs de module AST PZA.
5. **Ensemencement d'un tube contenant un antibiotique :** Pipeter de manière aseptique 0,5 mL d'incolum AST (cf. « PRÉPARATION DE L'INOCULUM ») dans le tube **MGIT** identifié « PZA ».
6. Bien reboucher les tubes. Mélanger soigneusement en renversant délicatement les tubes trois ou quatre fois.
7. Entrer le module PZA dans l'instrument **BACTEC MGIT** au moyen de la fonction de chargement du module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**). S'assurer que le tube Contrôle de croissance se trouve dans le premier emplacement de tube à gauche. Sélectionner l'antibiotique PZA pour la définition du support de portoir AST à deux tubes lors du chargement du module AST.
8. Inoculer 0,1 mL de la suspension de microorganisme sur une boîte de pétri de gélose **Trypticase** soja avec 5 % de sang de mouton (TSA II). Enfermer dans un sac plastique. Incuber entre 35 et 37 °C.
9. Rechercher la présence de contamination bactérienne sur la gélose au sang au bout de 48 heures. Si la gélose au sang ne présente aucune trace de développement bactérien, laisser le test PZA se poursuivre. Si la gélose au sang présente un développement bactérien, jeter le module PZA (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**) et répéter le test avec une culture pure de *Mycobacterium tuberculosis*.

Contrôle de qualité par l'utilisateur : Dès réception d'un nouvel arrivage ou d'un nouveau numéro de lot de flacons de trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA ou de milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA, il est recommandé de tester la souche de contrôle indiquée ci-dessous. La souche de contrôle doit être une culture pure, préparée conformément aux instructions de « PRÉPARATION DE L'INOCULUM ».

Le module AST de contrôle de qualité (QC) doit être préparé conformément à la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ». Plusieurs considérations sont importantes pour la préparation du module CQ AST : la bonne reconstitution des antibiotiques lyophilisés, l'utilisation d'une culture pure et la dilution adéquate de la souche de contrôle de qualité pour les tubes PZA et Contrôle de croissance. Il est important de n'ajouter l'antibiotique que dans le tube **MGIT** correspondant étiqueté « PZA ».

La même souche de contrôle doit être testée comme contrôle de qualité de lot une fois par semaine lorsque le test de sensibilité est effectué. L'observation des résultats corrects, tels qu'indiqués ci-dessous, dans les 4 à 20 jours signifie que les réactifs **BACTEC MGIT** 960 PZA sont prêts à l'emploi pour des tests d'isolats cliniques.

Si les résultats observés ne sont pas corrects, ne pas communiquer les résultats obtenus sur les isolats cliniques. Répéter les isolats cliniques et le contrôle de qualité concernés par l'échec du contrôle de qualité initial. Si le nouveau contrôle de qualité ne donne pas les résultats escomptés, ne pas communiquer les résultats cliniques. Ne pas utiliser le produit avant d'avoir contacté votre représentant local BD.

Souche	GC	MGIT PZA
M. tuberculosis ATCC 27294	Positif	Sensible

Pendant l'évaluation externe de la trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA, le temps moyen jusqu'à l'obtention du résultat de la souche de contrôle était de sept jours avec une plage de quatre à onze jours. Un ensemencement excessif des modules PZA et une contamination des cultures de contrôle de qualité étaient à l'origine des échecs les plus fréquents du contrôle de qualité pendant l'évaluation externe.

RESULTATS

L'instrument **BACTEC MGIT** contrôle les modules AST jusqu'à ce que la détermination de sensibilité ou de résistance soit effectuée. Une fois que le test est terminé, les résultats sont donnés par l'instrument **BACTEC MGIT** (se reporter au manuel d'utilisation de

l'instrument **BACTEC MGIT**). L'instrument **BACTEC MGIT** donne un résultat d'erreur (« X ») ou d'absence d'interprétation de sensibilité pour le module AST lorsque certaines conditions susceptibles d'influer sur les résultats du test sont rencontrées. Les conditions susceptibles de se traduire par un résultat d'erreur (« X ») sont décrites dans la Section 7 – Résolution des problèmes dans le manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**.

Il est important d'inclure la méthode de test, la concentration et le nom de l'antibiotique en rapportant les résultats. Le spécialiste des maladies pulmonaires et/ou infectieuses dans la prise en charge de la tuberculose doit être consulté au sujet du régime thérapeutique et des dosages appropriés.

La mono-résistance au pyrazinamide est peu commune ; en cas de résultats indiquant une résistance inattendue, vérifier la pureté et l'identification de l'isolat testé comme étant de type *M. tuberculosis*. Les directives des contrôles de pureté mycobactérienne sont consignées dans la norme CLSI M24.[2]

Documentation des résultats **BACTEC MGIT** 960 PZA

Antibiotique (concentration)	Résultat du système BACTEC MGIT	Résultat à rapporter	Action
PZA (100 µg/mL)	Sensible	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] ; résultat : sensible.	Aucune action.
	Résistant	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] ; résultat : résistant.	Si l'isolat est mono-résistant au PZA, confirmer que l'isolat testé est une culture pure de *Mycobacterium tuberculosis*.
	Erreur (« X »)	Aucun résultat donné	Renouveler le test

LIMITES DE LA METHODE

Le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA n'interprète pas le degré de sensibilité de l'isolat testé. Les résultats donnés sont soit sensible soit résistant.

Le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ne peut être effectué qu'au moyen d'un instrument **BACTEC MGIT**. Les modules PZA ne peuvent pas être lus manuellement.

N'utiliser que des cultures pures de *M. tuberculosis*. Les cultures contaminées ou qui contiennent des souches multiples de mycobactéries peuvent donner des résultats erronés et ne doivent pas être testées. Le test direct à partir d'échantillons cliniques n'est pas recommandé.

Il faut laisser reposer les suspensions réalisées à partir de milieux solides pendant les temps prescrits avant la normalisation. Les préparations d'inoculum réalisées à partir de milieux solides doivent être comparées visuellement au standard de turbidité McFarland 0,5 pour éviter tout risque de résultats inexacts ou d'erreur de module AST.

La non-utilisation de la dilution au 1:5 de la suspension de microorganismes, comme indiqué, pour ensemencer les tubes contenant des antibiotiques risque d'entraîner des résultats erronés.

La non-utilisation de la dilution au 1:10 de la suspension de microorganismes pour ensemencer le tube Contrôle de croissance risque d'entraîner des résultats erronés ou de causer une erreur du module AST.

La non-reconstitution de l'antimycobactérien PZA avec le volume approprié d'eau stérile distillée / désionisée risque d'entraîner des résultats erronés.

Il est important de bien mélanger le contenu des tubes ensemencés. Un mélange imparfait peut conduire à un faux résultat de résistance.

Ne pas charger les tubes du module AST dans le support de portoir AST en dehors de l'ordre indiqué ; cela risquerait d'entraîner des résultats erronés. Une mauvaise sélection de définition d'antibiotique pour le support de portoir risque d'entraîner des résultats non valides ou inexacts.

Le mauvais chargement du module AST dans l'instrument se traduit par une condition d'erreur anonyme qui doit être résolue dans les huit heures. Si la condition d'erreur n'est pas résolue dans les huit heures, le module AST doit être éliminé et configuré de nouveau.

La non-utilisation du supplément **BACTEC MGIT** 960 PZA dans le portoir AST PZA risque d'entraîner des résultats erronés. NE PAS ajouter de supplément **BACTEC MGIT** 960 SIRE ou de supplément de croissance **BACTEC MGIT** au portoir AST PZA.

La non-utilisation du supplément **BACTEC MGIT** 960 PZA dans le portoir AST PZA risque d'entraîner des résultats erronés. NE PAS remplacer les tubes d'indicateur de croissance de mycobactérie **BBL MGIT** 7 mL par un milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA.

VALEURS ATTENDUES

Au total, 118 isolats cliniques de *M. tuberculosis* ont été testés avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA dans quatre centres investigateurs éloignés géographiquement. Les tests incluaient des échantillons cliniques frais et des isolats repiqués provenant de cultures en milieux liquide et solide. Au total, 228 tests de sensibilité PZA (liquides et solides) ont été effectués.

Pendant l'évaluation externe de la trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA, neuf tests PZA ont été menés à partir d'isolats cliniques exigeant un renouvellement des tests en raison d'une contamination (six isolats) ou d'erreurs de procédure ou d'un ensemencement excessif (trois isolats).

Le délai moyen global d'obtention d'un résultat pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA est de sept jours sur un intervalle de quatre à dix-sept jours. Les données sont représentées à la figure 1 (voir la fin de la notice).

PERFORMANCES CARACTERISTIQUES

Etudes analytiques

Gammes d'inoculum AST pour milieux liquides et solides :

Milieux liquides – La procédure recommandée de préparation d'un module PZA à partir d'un tube **MGIT** 7 mL utilise un ensemencement direct le Jour 1 et le Jour 2 suivant la détermination de la positivité et un ensemencement dilué (1:5) les Jours 3 à 5 suivant la détermination de la positivité. Des études internes montrent que les inoculum préparés à partir d'un tube **MGIT** 7 mL positif du Jour 1 au Jour 5 comptent de 2,0 x 10^4 à 7,5 x 10^6 CFU/mL.

Milieux solides – La procédure recommandée de préparation d'un module PZA à partir d'une croissance bactérienne sur milieu solide (jusqu'à 14 jours après l'apparition de la première croissance) utilise une dilution au 1:5 de la suspension de microorganismes équivalente à un standard de McFarland 0,5. Des études internes montrent que les inoculum préparés à partir d'une culture sur milieu solide comptent de 2,1 x 10^5 à 3,9 x 10^6 CFU/mL.

Reproductibilité de lot :

La reproductibilité de lot a été évaluée en utilisant vingt-cinq souches de *M. tuberculosis* (y compris trois souches ATCC). Chaque souche a été testée en triple exemplaire avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA. Chaque répétition de test représentait

une condition de test distincte, différenciée par les lots d'antibiotique PZA, de supplément PZA et de milieu PZA utilisés (trois lots chacun).

Les résultats obtenus étaient comparés aux résultats attendus. La reproductibilité globale du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA est de 96,8 %.

Test du panel d'épreuve du CDC :

Les performances du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ont été évaluées en utilisant un panel de souches d'épreuve obtenu auprès du Centers for Disease Control and Prevention (Centre épidémiologique d'Atlanta aux États-Unis). Le panel se composait de neuf souches de *M. tuberculosis* aux profils de sensibilité connus (en utilisant le **BACTEC** 460TB). Chaque panel a été testé en triple exemplaire avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA. Les résultats obtenus avec **BACTEC MGIT** 960 PZA ont été comparés aux résultats attendus du CDC. La concordance globale avec les résultats attendus du CDC pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA est de 98,7 %.

Évaluation clinique

Le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA a été évalué dans quatre centres investigateurs éloignés géographiquement, comprenant des centres de référencement régionaux et des laboratoires de CHU, parmi lesquels deux centres situés hors des États-Unis. Le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA a été comparé à la méthode de test de sensibilité **BACTEC** 460TB PZA.

Test de reproductibilité :

La reproductibilité du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA a été évaluée dans les centres investigateurs en utilisant un panel de cinq souches qualifiées Les résultats obtenus avec **BACTEC MGIT** 960 PZA ont été comparés aux résultats attendus. La reproductibilité globale du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA est de 94 %.

Test du panel d'épreuve du CDC :

Les performances du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA ont été évaluées dans chacun des quatre centres investigateurs en utilisant un panel de souches d'épreuve obtenu auprès du Centers for Disease Control and Prevention (Centre épidémiologique d'Atlanta aux États-Unis). Le panel se composait de neuf souches de *M. tuberculosis* aux profils de sensibilité connus (en utilisant le **BACTEC** 460TB). Sur les trente-six résultats PZA recueillis avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA, trente-trois concordaient avec les résultats attendus du CDC. Le pourcentage de concordance avec les résultats attendus du CDC calculé pour le test de sensibilité du **BACTEC MGIT** 960 PZA est de 91,7 %.

Test d'isolats cliniques :

Au total, 118 isolats cliniques de *M. tuberculosis* ont été testés avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 PZA et le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 460TB PZA. Les tests incluaient des échantillons cliniques frais et des isolats repiqués provenant de cultures en milieux liquides et solides. Deux cent vingt-huit résultats de test ont été obtenus au total.

Le tableau 1 présente les résultats des tests effectués avec l'antibiotique PZA à 100 µg/mL sur des isolats cliniques provenant de cultures source liquides, de cultures source solides et des deux cultures sources combinées.

Tableau 1 : Résultats des isolats cliniques – Test de sensibilité BACTEC MGIT 960 PZA comparé au test de sensibilité BACTEC 460TB

		Système BACTEC 460TB		**Système BACTEC MGIT 960**			
		Résultats PZA attendus		**Résultats de sensibilité**		**Résultats de résistance**	
Source	**Nb de tests**	**S**	**R**	**Concordants**	**% concordant par catégorie (IC à 95 %)**	**Concordants**	**% concordant par catégorie (IC à 95 %)**
LIQUIDE	112	89	23	88	98,9 % (93,9–100)	22	95,7 % (78,1–99,9)
SOLIDE	113*	90	23	88	97,8 % (92,2–99,7)	20	87,0 % (66,4–97,2)
TOUS	225*	179	46	176	98,3 % (95,2–99,7)	42	91,3 % (79,2–97,6)

*Trois résultats **BACTEC** 460TB limites n'ont pas été repris dans ce tableau.

Tous les isolats aux résultats du test **BACTEC MGIT** 960 PZA discordants ont été testés en utilisant le test de sensibilité **BACTEC** 460TB PZA dans deux centres indépendants. Les résultats discordants correspondaient aux souches dont le résultat du test **BACTEC MGIT** 960 PZA différait du résultat du test **BACTEC** 460TB PZA. Les résultats limites ne font pas partie des calculs de performances liés à la trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA.

Parmi les quatre isolats testés discordants pour la sensibilité à PZA (S-**BACTEC MGIT** 960, R-**BACTEC** 460TB), un isolat a donné lieu à un résultat de sensibilité sur les deux centres indépendants, et les trois autres isolats ont donné lieu à un résultat de résistance sur les deux centres indépendants. Parmi les trois isolats testés discordants pour la résistance à PZA (R-**BACTEC MGIT** 960, S-**BACTEC** 460TB), tous les isolats présentaient des résultats de sensibilité sur les deux centres indépendants.

Deux des trois résultats PZA limites obtenus avec le test **BACTEC** 460TB (S-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) présentaient des résultats de sensibilité dans les deux centres indépendants. L'un des trois résultats PZA limites obtenus avec le test **BACTEC** 460TB (R-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) présentaient des résultats de sensibilité dans un centre indépendant. L'autre centre indépendant déterminait un résultat limite.

CONDITIONNEMENT

Réf.	**Description**
245128	Trousse **BACTEC MGIT** 960 PZA, carton de 2 flacons lyophilisés et de 6 suppléments PZA.
245115	Milieu **BACTEC MGIT** 960 PZA, carton de 25 tubes.

REFERENCES

Voir la section « References » dans la notice en anglais.

BD BACTEC MGIT 960-PZA-Kit

Zur Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* gegen Antibiotika bzw. Antituberkulotika

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit ist ein qualitatives Schnellverfahren zur Prüfung der Empfindlichkeit von *Mycobacterium tuberculosis* aus Kulturen gegen Pyrazinamid (PZA). Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit wird mit dem **BACTEC MGIT**-System verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antibiotika- bzw. Antituberkulotika-Empfindlichkeitsprüfungen sind im Hinblick auf eine angemessene Behandlung von Tuberkulose-Patienten von Nutzen. Tuberkulose wird normalerweise mit einer Kombination von Arzneimitteln, u.a. dem Antituberkulotikum Pyrazinamid, behandelt. Dabei ist eine ausreichende Aktivität der verordneten Antibiotika bzw. Antimykotika gegen *Mycobacterium tuberculosis* von Bedeutung, d.h., das Isolat muß gegen das Arzneimittel empfindlich sein.

Multiresistente *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme (MDR-TB) haben sich in jüngster Zeit zu einem ernsthaften Volksgesundheitsproblem entwickelt.[1] Bei einer Resistenz gegen eines der Primär-Arzneimittel, einschließlich Pyrazinamid, ist die Behandlung der Erkrankung schwieriger und kostenintensiver. Der schnelle Nachweis dieser resistenten Isolate ist von maßgeblicher Bedeutung für eine wirksame Behandlung des Patienten.

Bei der Empfindlichkeitsprüfung von Mykobakterien finden herkömmlicherweise zwei Methoden breite Anwendung. Bei der ersten Methode, der sogenannten Proportionsmethode[2], wird Middlebrook- und Cohn 7H10-Agar verwendet. Dabei werden Koloniezahlen auf Medien mit und ohne Arzneimittel verglichen. Zur Durchführung von Pyrazinamid-Empfindlichkeitsprüfungen müssen die herkömmlichen Methoden modifiziert werden, da dieses Arzneimittel *in vitro* nur bei niedrigen pH-Werten wirksam ist.[3] Die Proportionsmethode wurde dahingehend modifiziert, daß ein 7H10-Agarmedium mit einem pH-Wert von 5,5 und eine Arzneimittelkonzentration von 25–50 µg/mL verwendet wurde.[4] Eine Einschränkung dieser Methode ist jedoch der Umstand, daß viele *M. tuberculosis*-Isolate bei einem pH-Wert von 5,5 entweder nur schlecht oder überhaupt nicht wachsen. Methoden auf Agarbasis, wie die Agar-Proportionsmethode, haben sich für die PZA-Empfindlichkeitsprüfung als nicht zufriedenstellend erwiesen, da viele Isolate nicht wachsen, wenn der Agar für den PZA-Test angesäuert wurde.

Die zweite, als **BACTEC** 460TB-Radiometrie-Empfindlichkeitsmethode[5] bekannte, Methode beruht auf der durch das Mykobakterienwachstum bedingten Produktion von radioaktiv-markiertem Kohlendioxid (C^{14}), was durch die Zunahme des Wachstumsindex im System angezeigt wird. Es wurde eine modifizierte **BACTEC** 460TB-Empfindlichkeitsmethode entwickelt, die mit einem modifizierten radiometrischen 7H12-Medium, dem **BACTEC** PZA-Testmedium, und einem reduzierten pH-Wert von 6,0 funktioniert.[6] Bei diesem pH-Wert ist eine Bestimmung der PZA-Aktivität gegen Mykobakterien ohne Wachstumshemmung der meisten *M. tuberculosis*-Isolate möglich. Der **BACTEC** 460TB-PZA-Empfindlichkeitstest verwendet eine Pyrazinamid-Medikamentenkonzentration von 100 µg/mL. Die Empfindlichkeitsprüfung mit dem **BACTEC** 460TB-System hat sich als zufriedenstellend erwiesen und gilt derzeit als Referenzmethode für PZA-Empfindlichkeitsprüfungen. Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ehemals NCCLS) empfiehlt weiterhin, bei Anwendung der Proportionsmethode zwei Konzentrationen der Primärarzneimittel (außer Rifampin) zu verwenden.[2]

Der Einsatz des **BACTEC MGIT**-Gerätes in Verbindung mit dem **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit stellt eine nicht-radiometrische Methode der Bestimmung der antimykobakteriellen Empfindlichkeit im Hinblick auf PZA dar. Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit ermöglicht Empfindlichkeitsprüfungen bei Pyrazinamid-Konzentrationen von 100 µg/mL. Dieser Konzentrationswert korreliert mit der am **BACTEC** 460TB-System verwendeten Konzentration.

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Medium ist ein Röhrchen, das eine modifizierte Middlebrook 7H9-Bouillon enthält, die das Wachstum und den Nachweis von Mykobakterien bei einem reduzierten pH-Wert von 5,9 unterstützt. Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Medienröhrchen ist ein 16x100-mm-Röhrchen, in dessen rundem Boden eine fluoreszierende Verbindung in Silikon eingebettet ist. Diese fluoreszierende Verbindung spricht auf das Vorliegen von in der Bouillon gelöstem Sauerstoff an. Anfänglich ist nur eine geringe Fluoreszenz nachweisbar, da der gelöste Sauerstoff die Emissionen der Verbindung absorbiert. Später nehmen die aktiv wachsenden und respirierenden Mikroorganismen den Sauerstoff auf und ermöglichen das Fluoreszieren der Verbindung.

Das **BACTEC MGIT** 960 PZA-Testkit ist ein qualitativer Test, der 4–21 Tage dauert. Der Test basiert auf dem Vergleich des Wachstums eines *M. tuberculosis*-Isolats in einem arzneimittelhaltigen Röhrchen gegenüber einem arzneimittelfreien Röhrchen (Wachstumskontrolle). Das **BACTEC MGIT**-Gerät kontrolliert die Röhrchen im Hinblick auf zunehmende Fluoreszenz. Die Empfindlichkeit wird vom Gerät anhand einer Analyse der Fluoreszenz des arzneimittelhaltigen Röhrchens im Vergleich zur Fluoreszenz des Wachstumskontrollröhrchens bestimmt.

Das **BACTEC MGIT**-Gerät interpretiert diese Ergebnisse automatisch und gibt das Testergebnis – „empfindlich" oder „resistent" – aus.

REAGENZIEN

Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Mediumröhrchen enthält 110 µL Fluoreszenz-Indikator und 7 mL PZA-Bouillon. Der Indikator enthält Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin-rutheniumchlorid-pentahydrat in einer Silikonkautschukbasis. Die Röhrchen sind mit einer Polypropylenkappe verschlossen. Der pH-Wert ist auf 5,9 eingestellt.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Liter destillierten Wassers:

Modifizierte Middlebrook 7H9-Bouillon . . . . . .5,9 g
Caseinpepton . . . . . .1,25 g

Das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit enthält zwei Fläschchen mit lyophilisiertem Pyrazinamid und sechs Fläschchen mit PZA-Zusatz.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel: Pyrazinamid . . . . . .20.000 µg

Der **BACTEC MGIT** 960-PZA-Supplement enthält 15 mL Anreicherungssubstanz.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Liter destillierten Wassers:

Rinderalbumin . . . . . .50,0 g
Dextrose . . . . . .20,0 g
Polyoxyethylenstearat (POES) . . . . .1,1 g
Katalase . . . . . .0,03 g
Ölsäure . . . . . .0,1 g

**Nach Bedarf auf die Leistungskriterien abgestimmt und/oder ergänzt.*

Aufbewahrung und Rekonstituierung der Reagenzien:

BACTEC MGIT 960-PZA-Medium – Nach Erhalt bei 2–25 °C aufbewahren. NICHT EINFRIEREN. Die Bouillon sollte klar und farblos aussehen. Bei Trübung nicht verwenden. Vor Lichteinwirkung schützen. Gemäß der Kennzeichnung aufbewahrte Röhrchen können bis zum Verfallsdatum inokuliert werden.

BACTEC MGIT 960-PZA-Arzneimittelfläschchen – Fläschchen mit lyophilisiertem Arzneimittel nach Erhalt bei 2–8 °C aufbewahren. Nach dem Rekonstituieren kann die Antibiotikalösung eingefroren und bei mindestens -20 °C Kälte bis zu sechs Monate lang, jedoch nicht über das ursprüngliche Verfallsdatum hinaus, aufbewahrt werden. Sofort nach dem Auftauen verwenden. Nicht verwendete Anteile entsorgen.

BACTEC MGIT 960-PZA-Supplement – Nach Erhalt bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Vor dem Verfallsdatum öffnen und verwenden. Vor Lichteinwirkung schützen.

Gebrauchsanleitung:

Jedes **BACTEC MGIT** 960-PZA-Fläschchen mit lyophilisiertem Arzneimittel mit **2,5** mL sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 8000 µg/mL herzustellen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN: *In-vitro*-Diagnostikum.

POTENTIELL INFEKTIÖSE TESTPROBE: Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"[7-10] sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Beim Umgang mit *M. tuberculosis*-Wachstumskulturen sind Laborpraktiken, Sicherheitsvorkehrungen und -anlagen der Biosicherheitsstufe 3 erforderlich.

Die Anleitungen in allen relevanten Packungsbeilagen, einschließlich der des **BBL MGIT** 7-mL-Indikatorröhrchens für Mykobakterienwachstum, durchlesen und befolgen.

Röhrchen und Fläschchen vor Gebrauch auf Anzeichen von Kontaminierung oder Beschädigung untersuchen. Röhrchen oder Fläschchen, die unbrauchbar erscheinen, entsorgen. Röhrchen, die fallengelassen wurden, sorgfältig untersuchen. Bei Anzeichen von Beschädigungen das betreffende Röhrchen entsorgen.

Beim Bruch eines Röhrchens: 1) Geräteschubladen schließen; 2) Gerät abschalten; 3) betroffenen Bereich unverzüglich verlassen; 4) Richtlinien der betreffenden Institution bzw. der CDC beachten. Ein undichtes bzw. zerbrochenes inokuliertes Röhrchen kann ein Mykobakterien-Aerosol erzeugen; entsprechende Richtlinien zur Handhabung beachten.

Alle inokulierten **MGIT**-Röhrchen vor dem Entsorgen autoklavieren.

VORBEREITUNG DES INOKULUMS

Alle im Folgenden aufgeführten Vorbereitungsschritte sind mit *M. tuberculosis*-Reinkulturen durchzuführen. Das jeweilige Labor muß anhand geeigneter Identifizierungsmethoden bestätigen, daß es sich bei dem zu testenden Isolat um eine Reinkultur von *M. tuberculosis* handelt.

Das Inokulum kann aus festen Medien oder aus einem positiven **BACTEC MGIT** 7-mL-Röhrchen vorbereitet werden. Außerdem können in flüssigen und festen Medien angelegte Kulturen zur Vorbereitung eines **MGIT**-Inokulumröhrchens verwendet werden. Dieses kann anschließend wiederum zur Vorbereitung des Inokulums genutzt werden. Die einzelnen Möglichkeiten werden weiter unten beschrieben.

Vorbereitung des Inokulums aus festen Medien:

HINWEIS: Das Inokulum muß in Übereinstimmung mit den nachstehenden Anleitungen zubereitet werden, um eine ordnungsgemäße Organismuskonzentration für die Empfindlichkeitsprüfung zu gewährleisten.

1. In ein steriles, 8–10 Glasperlen enthaltendes, 16,5x128-mm-Röhrchen mit Kappe 4 mL **BBL**-Middlebrook-7H9-Bouillon (oder **BBL MGIT**-Bouillon) geben.
2. Von einer maximal 14 Tage alten Kultur mit Hilfe einer sterilen Öse möglichst viele Kolonien abschaben; dabei nach Möglichkeit kein festes Medium mit aufnehmen. Die Kolonien in der Middlebrook-7H9-Bouillon suspendieren.
3. Die Suspension 2–3 Minuten lang mit dem Vortexmischer mischen, um die größeren Klumpen zu zerspalten. Die Suspension sollte eine Trübung von über 1,0 McFarland aufweisen.
4. Die Suspension 20 Minuten lang ruhen lassen.
5. Den flüssigen Überstand in ein weiteres steriles 16,5x128-mm-Röhrchen mit Kappe transferieren (dabei möglichst kein Sediment transferieren) und weitere 15 Minuten lang ruhen lassen.
6. Den flüssigen Überstand (der gleichmäßig aussehen und keine Klumpen enthalten sollte) in ein drittes steriles 16,5x128-mm-Röhrchen transferieren. **HINWEIS:** Die Organismussuspension sollte bei diesem Schritt eine Trübung von über 0,5 McFarland aufweisen.
7. Die Suspension mittels Sichtvergleich auf einen McFarland-Trübheitsstandard von 0,5 einstellen. Nicht auf einen McFarland-Standard von weniger als 0,5 einstellen.
8. 1,0 mL der eingestellten Suspension mit 4 mL steriler Kochsalzlösung verdünnen (1:5-Verdünnung). Dies als AST-Inokulum verwenden, und mit dem „Inokulationsverfahren für den **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstest" fortfahren.

Vorbereitung des Inokulums aus einem positiven BACTEC MGIT 7-mL-Röhrchen:

1. Der erste Tag, an dem ein **BACTEC MGIT**-Röhrchen vom Gerät als positiv identifiziert wird, gilt als Tag 0.
2. Zur Zubereitung des Testinokulums sollte ein positives **MGIT**-7-mL-Röhrchen vom ersten Tag nach dem Positivwerden im **BACTEC MGIT**-Gerät (Tag 1) bis einschließlich des fünften Tages (Tag 5) verwendet werden. Von einem Röhrchen, das bereits mehr als fünf Tage lang positiv ist, sollte eine Subkultur in einem neuen **MGIT**-7-mL-Röhrchen mit **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement angelegt werden. Diese Subkultur sollte dann im **BACTEC MGIT**-Gerät bis zum Positivwerden getestet und innerhalb von ein bis fünf Tagen nach dem positiven Ergebnis verwendet werden. Siehe „Vorbereitung eines **MGIT**-Inokulumröhrchens aus flüssigen Medien".
3. Handelt es sich bei der Röhrchen-Positivität um Tag 1 oder 2, ist keine Verdünnung erforderlich. Dies als AST-Inokulum verwenden, und mit dem „Inokulationsverfahren für den **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstest" fortfahren.
4. Handelt es sich bei der Röhrchen-Positivität um Tag 3, 4 oder 5, 1 mL der positiven Bouillon in 4 mL steriler Kochsalzlösung verdünnen (1:5-Verdünnung). Den Röhrcheninhalt gut durchmischen. Dies als AST-Inokulum verwenden, und mit dem „Inokulationsverfahren für den **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstest" fortfahren.

Vorbereitung eines MGIT-Inokulumröhrchens aus flüssigen Medien:

1. Den Röhrcheninhalt durch Umdrehen bzw. mit dem Vortex-Mischer mischen.
2. Eine 1:100-Verdünnung herstellen, indem Sie 0,1 mL der Kultur zu 10 mL **BBL** Middlebrook-7H9-Bouillon bzw. **BBL MGIT**-Bouillon zugeben. Gut durchmischen.
3. 0,5 mL dieser Suspension in ein **MGIT** 7-mL-Röhrchen zugeben, dem 0,8 mL **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement zugesetzt sind.
4. Dicht verschließen und durch zwei- bis dreimaliges Umdrehen vorsichtig mischen.
5. Das Röhrchen in ein **BACTEC MGIT**-Gerät geben und testen, bis Sie ein positives Ergebnis erhalten.

   HINWEIS: Für die Verwendung als AST-Inokulum gilt: Bis zu einem positiven Testergebnis **müssen** mindestens 4 Tage vergehen. Falls ein positives Ergebnis in weniger als 4 Tagen feststeht, zu Schritt 1 zurückkehren und ein neues Inokulumröhrchen vorbereiten.
6. Dieses Röhrchen kann nun bis zu fünf Tagen nach Feststellen eines positiven Ergebnisses verwendet werden. Mit der oben beschriebenen „Vorbereitung des Inokulums aus einem positiven **BACTEC MGIT** 7-mL-Röhrchen" fortfahren.

Vorbereitung eines MGIT-Inokulumröhrchens aus festen Medien:

1. Eine sterile Öse verwenden und das Wachstum von der Schräge schaben. In ein **MGIT** 7-mL-Röhrchen geben, dem 0,8 mL **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement zugesetzt wurden.
2. Dicht verschließen und durch zwei- bis dreimaliges Umdrehen vorsichtig mischen.
3. Das Röhrchen in ein **BACTEC MGIT**-Gerät geben und testen, bis Sie ein positives Ergebnis erhalten.

   HINWEIS: Für die Verwendung als AST-Inokulum gilt: Bis zu einem positiven Testergebnis **müssen** mindestens 4 Tage vergehen. Falls ein positives Ergebnis in weniger als 4 Tagen feststeht, zu Schritt 1 zurückkehren und ein neues Inokulumröhrchen vorbereiten.
4. Dieses Röhrchen kann nun bis zu fünf Tagen nach Feststellen eines positiven Ergebnisses verwendet werden. Mit der oben beschriebenen „Vorbereitung des Inokulums aus einem positiven **BACTEC MGIT** 7-mL-Röhrchen" fortfahren.

VERFAHREN

Mitgelieferte Materialien: BACTEC MGIT 960-PZA-Kit mit je zwei Fläschchen der lyophilisierten Arzneimittel sowie sechs Fläschchen PZA-Supplement (ca. 50 Tests pro Kit).

Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Artikel: BACTEC MGIT 960-PZA-Medium (25 Röhrchen pro Karton), zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und die für dieses Verfahren benötigten Laborutensilien.

Inokulationsverfahren für den BACTEC MGIT 960-PZA-Empfindlichkeitstest:

Wichtige Parameter bei der Zubereitung des PZA-AST-Ansatzes sind die ordnungsgemäße Rekonstituierung der lyophilisierten Arzneimittel, die Verwendung einer reinen Kultur und die korrekte Organismusverdünnung für die Wachstumskontrolle- und PZA-Röhrchen. Das Arzneimittel darf nur in das als „PZA" gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen gegeben werden. Für den PZA-AST-Ansatz ausschließlich den/die mit dem Kit gelieferten **BACTEC MGIT** 960-PZA-Supplement und **BACTEC MGIT** 960-PZA-Medienröhrchen verwenden.

1. Für jedes zu testende Isolat zwei **BACTEC MGIT** 960-PZA-7-mL-Medienröhrchen kennzeichnen. Eines als „WK" (Wachstumskontrolle) und eines als „PZA" kennzeichnen. Die Röhrchen in der korrekten Anordnung in einem 2-Röhrchen-AST-Ansatzständer plazieren (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Gerätes).
2. Unter Anwendung aseptischer Kautelen in jedes Röhrchen 0,8 mL **BACTEC MGIT** 960-PZA-Supplement geben.
3. Mit Hilfe einer Mikropipette und unter Anwendung aseptischer Kautelen 100 µL der 8000 µg/mL **BACTEC MGIT** 960-PZA-Arzneimittellösung in das entsprechend gekennzeichnete **MGIT**-PZA-Röhrchen pipettieren. In das entsprechend gekennzeichnete **MGIT**-WK-Röhrchen keine PZA-Arzneimittellösung geben.

Arzneimittel	Konzentration des Arzneimittels nach der Rekonstituierung*	Den MGIT-Röhrchen zugegebene Volumina	Endkonzentration in den MGIT-Röhrchen
MGIT PZA	8000 µg/mL	100 µL	100 µg/mL*

*Zum Erhalt der angegebenen Konzentration PZA mit **2,5** mL sterilem/deionisiertem Wasser rekonstituieren.

4. **Vorbereitung und Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens:** Zur Vorbereitung der im Verhältnis **1:10** verdünnten Wachstumskontrollsuspension 0,5 mL des AST-Inokulums (siehe „VORBEREITUNG DES INOKULUMS") unter Anwendung aseptischer Kautelen in 4,5 mL sterile Kochsalzlösung pipettieren. Die Wachstumskontrollsuspension gut mischen. Das als „WK" gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen mit 0,5 mL der im Verhältnis **1:10** verdünnten Wachstumskontrollsuspension inokulieren.

   HINWEIS: Die Verwendung einer korrekt zubereiteten **1:10**-Verdünnung für das „WK"-Röhrchen ist von Bedeutung für die Erzielung korrekter AST-Ergebnisse und die Vermeidung von PZA-AST-Ansatzfehlern.
5. **Inokulation der arzneimittelhaltigen Röhrchen:** Unter Anwendung aseptischer Kautelen 0,5 mL des AST-Inokulums (siehe „VORBEREITUNG DES INOKULUMS") in das als „PZA" gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen pipettieren.
6. Die Röhrchen wieder fest verschließen. Den Inhalt der Röhrchen durch drei- bis viermaliges vorsichtiges Umdrehen gut mischen.
7. Den PZA-Ansatz mit Hilfe der AST-Eingabefunktion in das **BACTEC MGIT**-Gerät eingeben (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Gerätes). Sicherstellen, daß sich das Wachstumskontrollröhrchen in der ersten Röhrchenposition links befindet. Bei der Eingabe des AST-Ansatzes PZA als das Arzneimittel im 2-Röhrchen-AST-Ansatzständer angeben.
8. 0,1 mL der Organismussuspension auf einer **Trypticase**-Soja-Agarplatte mit 5 % Schafblut (TSA II) ausstreichen. In einem Plastikbeutel verschließen. Bei 35–37 °C inkubieren.
9. Die Blutagarplatte nach 48 Stunden im Hinblick auf bakterielle Kontaminierung überprüfen. Wenn die Blutagarplatte kein Wachstum aufweist, die PZA-Empfindlichkeitsprüfung fortsetzen. Wenn die Blutagarplatte Wachstum aufweist, den PZA-Ansatz verwerfen (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Gerätes) und den Test mit einer *Mycobacterium tuberculosis*-Reinkultur wiederholen.

Qualitätssicherung durch den Benutzer: Es wird empfohlen, bei Erhalt einer neuen Sendung oder Chargennummer von **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kitröhrchen oder **BACTEC MGIT** 960-PZA-Medium den nachstehend aufgeführten Kontrollorganismus zu testen. Der Kontrollorganismus sollte eine Reinkultur sein, die in Übereinstimmung mit den Anleitungen unter „VORBEREITUNG DES INOKULUMS" angelegt werden sollte.

Der AST-Qualitätskontrollansatz sollte in Übereinstimmung mit den Anleitungen unter „Inokulationsverfahren für den **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest" zubereitet werden. Bei der Zubereitung des AST-Qualitätskontrollansatzes muß auf die ordnungsgemäße Rekonstituierung des lyophilisierten Arzneimittels, die Verwendung einer reinen Kultur und die korrekte Verdünnung des Qualitätskontrollorganismus für die Wachstumskontrolle- und PZA-Röhrchen geachtet werden. Das Arzneimittel darf nur in das als „PZA" gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen gegeben werden.

Der gleiche Kontrollorganismus sollte bei der Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen einmal wöchentlich als Qualitätskontrolle getestet werden. Wenn die nachstehend aufgeführten korrekten Ergebnisse innerhalb von 4–20 Tagen erzielt werden, können die **BACTEC MGIT** 960 PZA-Reagenzien zum Testen von Patientenisolaten verwendet werden.

Werden die korrekten Ergebnisse nicht erzielt, keine Patientenergebnisse berichten. Den Test des Qualitätskontrollorganismus und aller von dem ursprünglichen QK-Fehler betroffenen Patientenisolate wiederholen. Wenn auch die erneute Qualitätskontrollprüfung nicht die erwarteten Ergebnisse erbringt, keine Patientenergebnisse berichten. Das Produkt nicht verwenden und den technischen Kundendienst verständigen.

Stamm	WK	MGIT PZA
M. tuberculosis ATCC 27294	Positiv	Empfindlich

Bei der extern durchgeführten Beurteilung des **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kits betrug die durchschnittliche Zeitspanne bis zum Erhalt eines Ergebnisses für den Kontrollorganismus sieben Tage (Bereich: vier bis elf Tage). Bei der extern durchgeführten Beurteilung waren die häufigsten Ursachen für das Scheitern von Qualitätskontrolltests über-inokulierte PZA-Ansätze und kontaminierte QK-Kulturen.

ERGEBNISSE

Das **BACTEC MGIT**-Gerät überwacht die AST-Ansätze bis zu deren Bestimmung als „empfindlich" oder „resistent". Nachdem das Testen der Ansätze abgeschlossen ist, werden die Ergebnisse vom **BACTEC MGIT**-Gerät ausgegeben (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Gerätes). Das **BACTEC MGIT**-Gerät gibt das Ergebnis eines AST-Ansatzes als Fehler (X) aus (d.h., ohne Empfindlichkeitsinterpretation), wenn bestimmte Bedingungen vorliegen, die das Testergebnis beeinträchtigen könnten. Bedingungen, die zu einem Fehlerergebnis (X) führen können, sind in Kapitel 7, Fehlersuche, des **BACTEC MGIT**-Gerät-Benutzerhandbuchs aufgeführt.

Die Angabe der Testmethode, des Arzneimittelnamens und der Konzentration im Ergebnisbericht ist von Bedeutung. Bezüglich der Wahl der geeigneten Therapie und Dosierung sollte ein Facharzt für Lungen- und/oder Infektionskrankheiten mit entsprechenden TB-Kenntnissen hinzugezogen werden.

Mono-Resistenz gegen Pyrazinamid ist ungewöhnlich, weshalb bei außergewöhnlichen Resistenzergebnissen die Reinheit und Identifikation des als *M. tuberculosis* getesteten Isolats zu bestätigen sind. Richtlinien für Mykobakterien-Reinheitsprüfungen enthält die Norm CLSI M24.[2]

BACTEC MGIT 960-PZA-Ergebnisbericht

Arzneimittel (Konzentration)	BACTEC MGIT System-Ergebnis	Empfohlener Bericht	Maßnahmen
PZA (100 µg/mL)	Empfindlich	Isolat mit **BACTEC MGIT**-System [PZA/100 µg/mL] getestet. Ergebnis: empfindlich	Keine Maßnahmen.
	Resistent	Isolat mit **BACTEC MGIT**-System [PZA/100 µg/mL] getestet. Ergebnis: resistent	Weist das Isolat eine Mono-Resistenz gegen PZA auf, bestätigen, daß es sich bei dem getesteten Isolat um eine Reinkultur von *Mycobacterium tuberculosis* handelt.
	Fehler (X)	Kein Bericht.	Test wiederholen.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Der **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest beurteilt nicht den Empfindlichkeitsgrad des getesteten Isolats. Als Ergebnis wird entweder „empfindlich" oder „resistent" berichtet.

Der **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest kann nur mit einem **BACTEC MGIT**-Gerät durchgeführt werden. Die PZA-Ansätze können nicht manuell interpretiert werden.

Nur Reinkulturen von *M. tuberculosis* verwenden. Kontaminierte Kulturen oder Kulturen mit mehreren Mykobakterien-Spezies können zu fehlerhaften Ergebnissen führen und sollten nicht getestet werden. Direkttests klinischer Proben werden nicht empfohlen.

Aus festen Medien hergestellte Suspensionen müssen sich vor der Standardisierung die vorgeschriebene Zeitspanne lang absetzen. Inokula, die aus festen Medien zubereitet wurden, sollten visuell mit einem 0,5 McFarland-Trübheitsstandard verglichen werden; andernfalls kann es zu inkorrekten Ergebnissen oder AST-Ansatzfehlern kommen.

Wenn bei entsprechender Indikation keine 1:5-Verdünnung der Organismussuspension zur Inokulation des Arzneimittelröhrchens verwendet wird, kann es zu inkorrekten Ergebnissen kommen.

Wenn zur Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens keine 1:10-Verdünnung der Organismussuspension verwendet wird, kann es zu inkorrekten Ergebnissen oder AST-Ansatzfehlern kommen.

Wird das PZA-Arzneimittel nicht mit der korrekten Menge sterilen destillierten/deionisierten Wassers rekonstituiert, kann dies zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Gutes Mischen der inokulierten Röhrchen ist von Bedeutung. Werden die Röhrchen nicht gut genug gemischt, kann es fälschlicherweise zu „resistent"-Ergebnissen kommen.

Wenn die Röhrchen des AST-Ansatzes nicht in der korrekten Anordnung im AST-Ansatzständer plaziert werden, kann es zu inkorrekten Ergebnissen kommen. Wenn die falsche Arzneimitteldefinition für den Ansatzständer gewählt wird, kann es zu ungültigen oder inkorrekten Ergebnissen kommen.

Wenn der AST-Ansatz nicht korrekt in das Gerät geladen wird, kann es zum Fehlerzustand „anonym" kommen, der innerhalb von 8 Stunden behoben werden muß. Wenn der Fehlerzustand nicht innerhalb von 8 Stunden behoben wird, muß der AST-Ansatz verworfen und neu vorbereitet werden.

Wenn der **BACTEC MGIT** 960-PZA-Supplement nicht im AST-Ansatz verwendet wird, kann es zu inkorrekten Ergebnissen kommen. KEINEN **BACTEC MGIT** 960-SIRE-Supplement und KEINEN **BACTEC MGIT**-Wachstumszusatz zum PZA-AST-Ansatz hinzufügen.

Wenn das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Medium nicht im PZA-AST-Ansatz verwendet wird, kann es zu inkorrekten Ergebnissen kommen. KEINE **BBL MGIT**-7-mL-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum anstelle des **BACTEC MGIT** 960-PZA-Mediums verwenden.

ERWARTETE WERTE

Insgesamt wurden 118 klinische Isolate von *M. tuberculosis* an vier verschiedenen geographischen Standorten mit dem **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest getestet. Die Tests wurden sowohl mit frischen klinischen Isolaten als auch mit Subkultur-Isolaten aus flüssigen und festen Kulturen durchgeführt. Insgesamt wurden 228 PZA-Empfindlichkeitsprüfungen (flüssiger und fester Kulturen) durchgeführt.

Bei der extern durchgeführten Beurteilung des **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kits erforderten neun PZA-Tests klinischer Isolate erneute Tests aufgrund von Kontaminierung (sechs Isolate) oder Über-Inokulation/Verfahrensfehlern (drei Isolate).

Die durchschnittliche Zeitspanne bis zum Erhalt eines Ergebnisses beträgt beim **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest sieben Tage (Bereich: vier bis siebzehn Tage). Diese Daten sind in Abbildung 1 am Ende der Packungsbeilage aufgeführt.

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Studien

AST-Inokulationsbereiche bei flüssigen und festen Medien:

Flüssige Medien – Das empfohlene Verfahren zur Zubereitung eines PZA-Ansatzes aus einem positiven **MGIT**-7-mL-Röhrchen schreibt die Verwendung eines direkten Inokulums von Tag 1 und Tag 2 nach dem Positivwerden und eines im Verhältnis 1:5 verdünnten Inokulums von Tag 3 bis Tag 5 nach dem Positivwerden vor. Intern durchgeführte Studien zeigten, daß Inokula, die aus einem positiven **MGIT**-7-mL-Röhrchen von Tag 1 bis Tag 5 nach dem Positivwerden zubereitet wurden, zwischen 2,0 x 10^4 und 7,5 x 10^6 KBE/mL enthalten.

Feste Medien – Das empfohlene Verfahren zur Zubereitung eines PZA-Ansatzes aus dem Wachstum eines festen Mediums (bis zu 14 Tage nach Erscheinen des ersten sichtbaren Wachstums) schreibt die Verwendung einer im Verhältnis 1:5 verdünnten

Organismussuspension mit einer Trübung entsprechend 0,5 McFarland vor. Intern durchgeführte Studien zeigten, daß Inokula, die aus einem festen Kulturmedium zubereitet wurden, zwischen 2,1 x 10^5 und 3,9 x 10^6 KBE/mL enthalten.

Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge:

Die Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge wurde anhand von fünfundzwanzig *M. tuberculosis*-Stämmen (einschließlich drei ATCC-Stämmen) beurteilt. Jeder Stamm wurde im Dreifachansatz mit dem **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest getestet. Jedes Replikat repräsentierte eine andere Testbedingung, die sich hinsichtlich der Charge des PZA-Arzneimittels, des PZA-Zusatzes und des PZA-Mediums (je drei Chargen) unterschieden.

Die erzielten Ergebnisse wurden mit den erwarteten Ergebnissen verglichen. Die insgesamte Reproduzierbarkeit für den **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest betrug 96,8 %.

Testen eines CDC-Referenzprofils:

Die Leistung des **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstests wurde anhand eines Profils aus Referenzstämmen der US-amerikanischen Seuchenschutzbehörde CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) beurteilt. Das Profil bestand aus neun *M. tuberculosis*-Stämmen mit bekannten Empfindlichkeitsmustern (unter Anwendung von **BACTEC** 460TB). Das Profil wurde im Dreifachansatz mit dem **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest getestet. Die Ergebnisse der Prüfungen mit dem **BACTEC MGIT** 960 PZA-Test wurden mit den CDC-Referenzergebnissen verglichen. Die insgesamte Übereinstimmung des **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstests mit den CDC-Referenzergebnissen beträgt 98,7 %.

Klinische Beurteilung

Der **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstest wurde an vier verschiedenen geographischen klinischen Standorten beurteilt. Dabei handelte es sich um regionale Referenzzentren und Labors von Universitätskliniken in den USA, einschließlich zweier nicht in den USA liegender Standorte. Der **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstest wurde mit dem **BACTEC** 460TB-PZA-Empfindlichkeitstest verglichen.

Reproduzierbarkeitstests:

Die Reproduzierbarkeit der Prüfungen mit dem **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest wurde an den klinischen Standorten anhand eines aus fünf qualifizierten Stämmen bestehenden Profils beurteilt. Die Ergebnisse der **BACTEC MGIT** 960 PZA-Prüfung wurden mit den erwarteten Ergebnissen verglichen. Die insgesamte Reproduzierbarkeit des **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstests betrug 94 %.

Testen eines CDC-Referenzprofils:

Die Leistung des **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstests wurde an jedem der vier klinischen Standorte anhand eines Profils aus Referenzstämmen der US-amerikanischen Seuchenschutzbehörde CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) beurteilt. Das Profil bestand aus neun *M. tuberculosis*-Stämmen mit bekannten Empfindlichkeitsmustern (unter Anwendung von **BACTEC** 460TB). Von den sechsunddreißig mit dem **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstest erhaltenen Ergebnissen stimmten dreiunddreißig mit den CDC-Referenzergebnissen überein. Die berechnete prozentuale Übereinstimmung der Ergebnisse des **BACTEC MGIT** 960-PZA-Empfindlichkeitstests mit den CDC-Referenzergebnissen beträgt 91,7 %.

Testen klinischer Isolate:

Insgesamt wurden 118 klinische Isolate von *M. tuberculosis* mit dem **BACTEC MGIT** 960 PZA-Empfindlichkeitstest und dem **BACTEC** 460TB-PZA-Empfindlichkeitstest getestet. Dabei wurden sowohl frische klinische Isolate als auch Subkultur-Isolate aus flüssigen und festen Kulturen getestet. Hierbei ergaben sich insgesamt 228 Testergebnisse.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der im Hinblick auf 100 µg/mL des PZA-Arzneimittels getesteten klinischen Isolate aufgeführt (Ergebnisse von flüssigen Kulturen, festen Kulturen und beide zusammen).

Tabelle 1: Ergebnisse für klinische Isolate – BACTEC MGIT 960-PZA-Empfindlichkeitstest im Vergleich zum BACTEC 460TB-Empfindlichkeitstest

		BACTEC 460TB-System		BACTEC MGIT 960-System			
		Erwartete PZA-Ergebnisse		„Empfindlich"-Ergebnisse		„Resistent"-Ergebnisse	
Quelle	Anzahl der Tests	E	R	Anzahl der Übereinstimmungen	Kategorie-Übereinstimmung (%) (95-%-VI)	Anzahl der Übereinstimmungen	Kategorie-Übereinstimmung (%) (95-%-VI)
FLÜSSIG	112	89	23	88	98,9 % (93,9–100)	22	95,7 % (78,1–99,9)
FEST	113*	90	23	88	97,8 % (92,2–99,7)	20	87,0 % (66,4–97,2)
ALLE	225*	179	46	176	98,3 % (95,2–99,7)	42	91,3 % (79,2–97,6)

*Drei grenzwertige **BACTEC** 460TB-Ergebnisse sind nicht in dieser Tabelle aufgeführt.

Alle Isolate mit diskrepanten **BACTEC MGIT** 960-PZA-Testergebnissen wurden an zwei unabhängigen Standorten mit dem **BACTEC** 460TB-PZA-Empfindlichkeitstest getestet. Bei den diskrepanten Ergebnissen handelte es sich um diejenigen Stämme, bei denen das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Testergebnis vom **BACTEC** 460TB-PZA-Testergebnis abwich. Grenzwertige Ergebnisse gingen nicht in die Leistungsberechnungen für das **BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit ein.

Von den vier diskrepanten Isolaten (S-**BACTEC MGIT** 960, R-**BACTEC** 460TB) mit PZA-Empfindlichkeit erbrachte eines an beiden Standorten „empfindlich"-Ergebnisse, die anderen drei erbrachten an beiden Standorten „resistent"-Ergebnisse. Alle drei diskrepanten Isolate (R-**BACTEC MGIT** 960, S-**BACTEC** 460TB) mit PZA-Resistenz erbrachten an beiden unabhängigen Standorten „empfindlich"-Ergebnisse.

Zwei der drei grenzwertigen **BACTEC** 460TB-PZA-Ergebnisse (S-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) erbrachten „empfindlich"-Ergebnisse an beiden unabhängigen Standorten. Eines der drei grenzwertigen **BACTEC** 460TB-PZA-Ergebnisse (R-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) erbrachte ein „empfindlich"-Ergebnis an einem unabhängigen Standort. Der andere unabhängige Standort ermittelte ein grenzwertiges Ergebnis.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
245128	**BACTEC MGIT** 960-PZA-Kit, Karton mit 2 Fläschchen lyophilisierten Arzneimittels und sechs Fläschchen PZA-Zusatz.
245115	**BACTEC MGIT** 960-PZA-Medium, Karton mit 25 Röhrchen.

LITERATUR

Siehe den Abschnitt „References" im englischen Text.

BD Kit BACTEC MGIT 960 PZA

Per il test di sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis* agli agenti antimicobatterici

Italiano

USO PREVISTO

Il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA è un procedimento qualitativo rapido per analizzare la sensibilità alla pirazinamide (PZA) del *Mycobacterium tuberculosis* da coltura. Il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA viene usato con il sistema **BACTEC MGIT**.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il test di sensibilità antimicobatterica è importante per stabilire la terapia corretta dei pazienti affetti da tubercolosi. La terapia della tubercolosi si basa generalmente su un regime a più farmaci che includa la pirazinamide. È importante che i farmaci antimicobatterici prescritti manifestino attività specifica contro il *Mycobacterium tuberculosis*, ossia che il ceppo isolato sia sensibile al farmaco.

L'incidenza di ceppi multiresistenti di *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) è diventata recentemente un serio problema di sanità pubblica.[1] La possibile resistenza a uno dei quattro farmaci primari, inclusa la pirazinamide, rende la malattia ancora più difficile e costosa da curare; pertanto la rilevazione rapida di questi ceppi è essenziale ai fini di un trattamento efficace dei pazienti.

I metodi più comunemente usati per il test di sensibilità agli agenti antimicobatterici sono due. Il primo, conosciuto come metodo delle proporzioni,[2] utilizza Agar Middlebrook e Cohn 7H10 e confronta i conteggi delle colonie presenti su terreni contenenti e su terreni senza farmaci. Il test di sensibilità alla pirazinamide richiede alcune modifiche rispetto ai metodi convenzionali in quanto il farmaco è attivo *in vitro* solo ai valori inferiori di pH.[3] Una modifica del metodo delle proporzioni è stata realizzata utilizzando un terreno agar 7H10 a pH 5,5, con una concentrazione di farmaco di 25–50 µg/mL.[4] Questo metodo presenta tuttavia una limitazione in quanto ad un pH di 5,5 molti isolati di *M. tuberculosis* non crescono o esibiscono una crescita inadeguata. I metodi su base agar, come il metodo delle proporzioni, non sono risultati soddisfacenti per il test della sensibilità alla PZA in quanto la crescita di molti isolati è venuta meno quando l'agar è stato acidificato per il test PZA.

Il secondo metodo, noto come metodo della sensibilità radiometrica **BACTEC** 460TB,[5] è basato sulla produzione di anidride carbonica radioattiva marcata con ^{14}C da parte dei micobatteri in crescita. Tale produzione è evidenziata da un aumento dell'indice di crescita nel sistema. Una modifica del metodo della sensibilità **BACTEC** 460TB è stata realizzata utilizzando un terreno radiometrico 7H12 modificato, il terreno per test **BACTEC** PZA, con un pH ridotto pari a 6,0.[6] A tale pH, è possibile determinare l'attività antimicobatterica della PZA senza inibire la crescita della maggior parte degli isolati di *M. tuberculosis*. Il test di sensibilità **BACTEC** 460TB PZA utilizza una concentrazione di pirazinamide di 100 µg/mL. Il test della sensibilità eseguito nel sistema **BACTEC** 460TB è risultato soddisfacente e viene attualmente considerato come il metodo di riferimento per le prove di sensibilità alla PZA. Il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, già NCCLS) consiglia tuttora di impiegare, nella procedura di analisi con il metodo delle proporzioni, due concentrazioni di farmaci primari, eccetto la rifampicina.[2]

L'uso dello strumento **BACTEC MGIT** in combinazione con il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA costituisce un metodo non radiometrico per la determinazione della sensibilità antimicobatterica alla pirazinamide. Il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA è stato sviluppato per consentire la determinazione della sensibilità a concentrazioni di pirazinamide pari a 100 µg/mL. Questa concentrazione si correla con quella utilizzata nel sistema **BACTEC** 460TB.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La provetta di terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene un brodo Middlebrook 7H9 modificato che favorisce la crescita e l'individuazione dei micobatteri ad un pH ridotto pari a 5,9. La provetta di terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene un composto fluorescente fissato in silicone sul fondo di una provetta a base circolare da 16 x 100 mm. Il composto fluorescente è sensibile all'ossigeno dissolto nel brodo. La concentrazione iniziale di ossigeno dissolto attenua l'emissione dal composto e limita l'intensità della fluorescenza rilevabile. Successivamente, i microrganismi in crescita attiva consumano l'ossigeno permettendo così una maggiore fluorescenza del composto.

Il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA è un test qualitativo di 4–21 giorni. Il test è basato sul confronto tra la crescita di un isolato di *M. tuberculosis* in una provetta contenente farmaco e in una provetta senza farmaco (Controllo di crescita). Lo strumento **BACTEC MGIT** controlla l'aumento della fluorescenza nelle provette. Per determinare i risultati di sensibilità, lo strumento rileva la fluorescenza nella provetta con il farmaco e la confronta con la fluorescenza nella provetta del Controllo di crescita.

Lo strumento **BACTEC MGIT** interpreta automaticamente i risultati ottenuti e riporta un risultato di sensibilità o di resistenza.

REAGENTI

La provetta di terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene 110 µL di indicatore fluorescente e 7 mL di brodo di PZA. L'indicatore contiene cloruro di rutenio pentaidrato tri 4,7-difenil-1,10 fenantrolina in una base di gomma siliconica. Le provette sono chiuse con un tappo di polipropilene. Il pH è regolato a 5,9.

Formula riveduta* per L di acqua purificata

Brodo Middlebrook 7H9 modificato . . . . . 5,9 g
Peptone di caseina . . . . . 1,25 g

Il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene due flaconi di polvere liofilizzata di pirazinamide e sei flaconi di supplemento PZA.

Formula riveduta* per flacone di farmaco liofilizzato. Pirazinamide . . . . . .20.000 µg

Il supplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene 15 mL di terreno di arricchimento.

Formula riveduta* per L di acqua purificata

Albumina bovina . . . . . .50,0 g
Destrosio . . . . . .20,0 g
Stearato di poliossietilene (POES) . . . . . .1,1 g
Catalasi . . . . . .0,03 g
Acido oleico . . . . . .0,1 g

**Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.*

Conservazione e ricostituzione dei reagenti

Terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA – Alla consegna, conservare a 2–25 °C. NON CONGELARE. Il brodo deve essere limpido e incolore. Non usarlo se è torbido. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Le provette non ancora utilizzate e conservate come indicato sull'etichetta, possono essere inoculate fino alla data di scadenza.

Flaconi di farmaci **BACTEC MGIT** 960 PZA – Alla consegna, conservare i flaconi dei farmaci liofilizzati a 2–8 °C. Una volta ricostituita, la soluzione di antibiotico può essere congelata e conservata a temperatura di -20 °C o inferiore fino a sei mesi, ma non oltre la data di scadenza originaria. Una volta scongelata la soluzione, usarla immediatamente. Eliminare le aliquote non utilizzate.

Supplemento **BACTEC MGIT** PZA – Alla consegna, conservare il prodotto al buio a 2–8 °C. Non congelare o riscaldare eccessivamente. Aprire ed usare prima della data di scadenza. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.

Istruzioni per l'uso

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di streptomicina del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA con **2,5** mL di acqua distillata/deionizzata sterile, per ottenere una soluzione stock di 8000 µg/mL.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI – Per uso diagnostico *in vitro*.

CAMPIONI DI ANALISI POTENZIALMENTE INFETTI - I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana. Nel maneggiare qualsiasi oggetto contaminato con sangue o altri liquidi biologici, occorre attenersi alle direttive del presidio locale e alle "precauzioni standard".[7-10]

Quando si lavora con una coltura in crescita di *M. tuberculosis*, è necessario attenersi alle procedure di sicurezza biologica (BSL) di livello 3 e disporre di attrezzature e recipienti conformi alle misure di contenimento.

Leggere e seguire le istruzioni contenute nei fogli illustrativi contenuti nelle rispettive confezioni, compreso quello della provetta di indicatore di crescita dei micobatteri **BBL MGIT** da 7 mL.

Prima dell'uso, esaminare le provette e i flaconi per accertarsi che non siano contaminati o danneggiati. Eliminare le provette e i flaconi che risultano non idonei. Esaminare con attenzione le provette cadute ed eliminarle se risultano danneggiate.

In caso di rottura di una provetta: 1) chiudere i cassetti dello strumento; 2) spegnere lo strumento; 3) sgombrare immediatamente la zona; 4) consultare i regolamenti del laboratorio utilizzato o dei CDC . Una provetta inoculata rotta o che perde può produrre un aerosol di micobatteri e pertanto deve essere trattata in modo opportuno.

Prima di eliminare tutte le provette **MGIT** inoculate, sterilizzarle in autoclave.

PREPARAZIONE DELL'INOCULO

Le modalità di preparazione illustrate qui di seguito si riferiscono a colture pure di *M. tuberculosis*. Il laboratorio deve confermare, mediante tecniche di identificazione appropriate, che l'isolato da testare è una coltura pura di *M. tuberculosis*.

L'inoculo può essere preparato a partire da terreno solido o da una provetta **BACTEC MGIT** 7 mL. Le colture cresciute su terreno liquido e solido possono anche essere utilizzate per preparare una provetta **MGIT** di semina, a sua volta usata per preparare l'inoculo. Ognuna di queste opzioni è descritta qui di seguito.

Preparazione dell'inoculo da terreno solido:

NOTA - Al fine di ottenere la concentrazione appropriata di organismi per il test di sensibilità, è importante preparare l'inoculo in osservanza delle seguenti istruzioni.

1. Aggiungere 4 mL di brodo **BBL** Middlebrook 7H9 (o brodo **BBL MGIT**) in una provetta sterile da 16,5 x 128 mm con tappo e contenente 8–10 microsfere di vetro.
2. Con un'ansa sterile, prelevare quante più colonie possibile da una crescita di non oltre quattordici giorni, cercando di non rimuovere terreno solido. Sospendere le colonie nel brodo Middlebrook 7H9.
3. Agitare con vortex per 2–3 minuti la sospensione per frammentare i grumi più grossi. La torbidità della sospensione deve essere superiore allo standard 1,0 McFarland.
4. Lasciar riposare la sospensione per 20 minuti senza disturbarla.
5. Trasferire il supernatante in un'altra provetta sterile da 16,5 x 128 mm con tappo (evitare di trasferire il sedimento) e lasciar riposare per altri 15 minuti.
6. Trasferire il supernatante (dovrebbe essere omogeneo e privo di grumi) in una terza provetta sterile da 16,5 x 128 mm. **NOTA** - Durante questo passaggio, la torbidità della sospensione di organismi deve essere superiore allo standard 0,5 McFarland.
7. Regolare la torbidità della sospensione sullo standard 0,5 McFarland confrontandola visivamente con lo stesso standard. Non regolare ad una torbidità inferiore allo standard 0,5 McFarland.
8. Diluire 1 mL della sospensione così regolata in 4 mL di soluzione fisiologica sterile (diluizione 1:5). Usare questa soluzione come inoculo AST e passare alla "Procedura di inoculo per il test di sensibilità con il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA".

Preparazione dell'inoculo da una provetta BACTEC MGIT 7 mL positiva

1. Viene considerato Giorno 0 il primo giorno in cui si ottiene sullo strumento una provetta **BACTEC MGIT** positiva.
2. Per la preparazione dell'inoculo da testare, usare una provetta positiva **MGIT** da 7 mL a partire dal giorno successivo alla comparsa di positività (Giorno 1) sullo strumento **BACTEC MGIT**, fino al quinto giorno compreso di positività (Giorno 5). Una provetta positiva da oltre cinque giorni deve essere sottoposta a subcoltura in una nuova provetta **MGIT** da 7 mL contenente supplemento di crescita **BACTEC MGIT**, testata sullo strumento **BACTEC MGIT** fino alla comparsa di positività e quindi usata tra il primo e il quinto giorno dalla positività. Vedere "Preparazione di una provetta **MGIT** di semina a partire da terreno liquido".
3. Se la provetta è positiva nel Giorno 1 o Giorno 2, non è necessaria alcuna diluizione. Usare questa soluzione come inoculo AST e passare alla "Procedura di inoculo per il test di sensibilita con il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA".
4. Se la provetta è positiva nel Giorno 3, Giorno 4 o Giorno 5, diluire 1 mL di brodo positivo in 4 mL di soluzione fisiologica sterile (diluizione 1:5). Mescolare accuratamente. Usare questa soluzione come inoculo AST e passare alla "Procedura di inoculo per il test di sensibilità con il kit **BACTEC MGIT** 960 PZA".

Preparazione di una provetta MGIT di semina a partire da terreno liquido

1. Miscelare capovolgendo o vortexando la provetta.
2. Fare una diluizione 1:100 aggiungendo 0,1 mL di coltura a 10 mL di Brodo **BBL** Middlebrook 7H9 o Brodo **BBL MGIT**. Mescolare accuratamente.
3. Aggiungere 0,5 mL della sospensione ottenuta in una provetta **MGIT** 7 mL addizionata di 0,8 mL di supplemento di crescita **BACTEC MGIT**.
4. Tappare ermeticamente e miscelare accuratamente capovolgendo la provetta 2-3 volte.
5. Introdurre la provetta nello strumento **BACTEC MGIT** e analizzare fino al raggiungimento della positività.
   NOTA: La durata fino a positività **deve** essere di ≥ 4 giorni ai fini del test AST. Se la provetta raggiunge la positività in < 4 giorni, ritornare al punto 1 e preparare una nuova provetta di semina.
6. Dal momento di positività, la provetta può essere usata entro uno - cinque giorni. Procedere a "Preparazione dell'inoculo da una provetta **BACTEC MGIT** 7 mL positiva" (sopra).

Preparazione di una provetta MGIT di semina a partire da terreno solido

1. Con un'ansa sterile, rimuovere la crescita da uno slant e aggiungerla in una provetta **MGIT** 7 mL addizionata di 0,8 mL di supplemento di crescita **BACTEC MGIT**.
2. Tappare ermeticamente e miscelare accuratamente capovolgendo la provetta 2-3 volte.
3. Introdurre la provetta nello strumento **BACTEC MGIT** e testare fino al raggiungimento della positività.

NOTA: La durata fino a positività **deve** essere di ≥ 4 giorni ai fini del test AST. Se la provetta raggiunge la positività in < 4 giorni, ritornare al punto 1 e preparare una nuova provetta di semina.

4. Dal momento di positività, la provetta può essere usata entro uno - cinque giorni. Procedere a "Preparazione dell'inoculo da una provetta **BACTEC MGIT** 7 mL positiva" (sopra).

PROCEDURA

Materiali forniti - Kit **BACTEC MGIT** 960 PZA contenente due flaconi di ciascun farmaco liofilizzato e sei flaconi di supplemento PZA (circa 50 test per kit).

Materiali richiesti ma non forniti - Terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA (25 provette per scatola), terreni di coltura ausiliari, reagenti, organismi per il controllo di qualità e attrezzatura di laboratorio necessaria per questa procedura.

Procedura di inoculo per il test di sensibilità con il kit BACTEC MGIT 960 PZA

Durante la preparazione del set AST PZA, è importante accertare la corretta ricostituzione del farmaco liofilizzato, l'uso di coltura pura e la corretta diluizione dell'organismo sia per il Controllo di crescita che per la provetta PZA. È importante dispensare il farmaco solo nella provetta **MGIT** corrispondente con etichetta "PZA". Durante l'esecuzione del set AST PZA, usare solo il supplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA fornito con il kit e le provette di terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA.

1. Etichettare due provette di terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA da 7 mL per ogni isolato da testare. Contrassegnarne una come GC (Growth Control o Controllo di crescita) e una come PZA. Disporre le provette secondo la sequenza corretta nel carrello per set AST per due provette (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**).
2. In ogni provetta, dispensare in asepsi 0,8 mL di supplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA.
3. Con una micropipetta, dispensare in asepsi 100 µL della soluzione 8000 µg/mL di farmaco **BACTEC MGIT** 960 PZA nella provetta **MGIT** con l'etichetta appropriata. Non aggiungere la soluzione di PZA nella provetta **MGIT** GC debitamente etichettata.

Farmaco	Concentrazione del farmaco dopo la ricostituzione*	Volume dispensato nelle provette MGIT per il test	Concentrazione finale nelle provette MGIT
MGIT PZA	8000 µg/mL	100 µL	100 µg/mL*

*Per ottenere la concentrazione indicata, ricostituire la PZA con **2,5** mL di acqua sterile/deionizzata.

4. **Preparazione ed inoculo della provetta del Controllo di crescita** - Per preparare la sospensione **1:10** del Controllo di crescita, pipettare in asepsi 0,5 mL di inoculo AST (vedi "PREPARAZIONE DELL'INOCULO") in 4,5 mL di soluzione fisiologica sterile. Mescolare accuratamente la sospensione di Controllo di crescita. Inoculare 0,5 mL della sospensione **1:10** di Controllo di crescita in una provetta **MGIT** con etichetta "GC".

   NOTA - Per garantire l'accuratezza dei risultati AST ed evitare gli errori del set AST PZA, è importante usare una diluizione **1:10** correttamente preparata per la provetta "GC".
5. **Inoculo delle provette contenenti farmaco** - Pipettare in asepsi 0,5 mL di inoculo AST (vedi "PREPARAZIONE DELL'INOCULO") nella provetta **MGIT** con etichetta "PZA".
6. Chiudere bene le provette con il tappo. Mescolare accuratamente capovolgendo con attenzione le provette tre o quattro volte.
7. Introdurre il set PZA nello strumento **BACTEC MGIT** usando la funzione di ingresso del set AST (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**). Assicurarsi che la provetta Controllo di crescita si trovi nella prima posizione di sinistra. Quando si attiva la funzione di ingresso del set AST, selezionare PZA come farmaco nella definizione del carrello AST a 2 provette.
8. Seminare 0,1 mL di sospensione dell'organismo su una piastra di Agar soia **Trypticase** con 5% di sangue di montone (TSA II). Inserire in una busta di plastica e incubare a 35–37 °C.
9. Controllare la piastra di agar sangue dopo 48 ore per verificare l'eventuale presenza di contaminazione batterica. Se non si nota alcuna crescita sulla piastra, continuare il test PZA. Se si notano segni di crescita sulla piastra, eliminare il set PZA (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**) e ripetere il test con una coltura pura di *Mycobacterium tuberculosis*.

Controllo di qualità a cura dell'operatore - Per ogni nuova partita o nuovo numero di lotto di flaconi del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA o di terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA, si raccomanda di testare l'organismo di controllo indicato di seguito. L'organismo di controllo deve provenire da una coltura pura preparata secondo le istruzioni contenute in "PREPARAZIONE DELL'INOCULO".

Il set AST per il controllo di qualità (CQ) deve essere preparato in osservanza delle istruzioni contenute in "Procedura di inoculo per il test di sensibilita **BACTEC MGIT** 960 PZA". Durante la preparazione del set AST CQ, è importante accertare la corretta ricostituzione del farmaco liofilizzato, l'uso di coltura pura e la corretta diluizione dell'organismo di Controllo di qualità sia per il Controllo di crescita che per le provette PZA. È importante dispensare il farmaco solo nella provetta **MGIT** corrispondente con etichetta "PZA".

Lo stesso organismo di controllo deve essere testato come controllo di qualità in batch una volta alla settimana, quando si esegue il test di sensibilità. Se entro 4–20 giorni si ottengono risultati conformi a quelli della tabella seguente, i reagenti **BACTEC MGIT** 960 PZA sono pronti per il test degli isolati di pazienti.

Se non si ottengono i risultati appropriati, non riportare i risultati dei pazienti. Ripetere il controllo di qualità per gli isolati di pazienti associati al fallimento iniziale del controllo di qualità. Se la replica del controllo di qualità non fornisce i risultati attesi, non riportare i risultati dei pazienti. Non usare il prodotto finché non si sia contattato il rappresentante locale BD.

Ceppo	GC	MGIT PZA
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensibile

Durante la valutazione esterna del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA, il risultato per l'organismo di controllo è stato ottenuto in media in sette giorni, con un range da quattro a undici giorni. Le cause più comuni di fallimento del controllo di qualità durante la valutazione esterna sono da attribuire alla eccessiva inoculo dei set PZA e alla contaminazione delle colture di controllo di qualità.

RISULTATI

Lo strumento **BACTEC MGIT** esegue il monitoraggio dei set AST fino a quando viene determinata una sensibilità o una resistenza. Una volta completato il test del set, lo strumento **BACTEC MGIT** riporta i risultati (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**). In presenza di condizioni che potrebbero influire sui risultati del test, lo strumento **BACTEC MGIT** riporterà il risultato del set AST come Errore ("X"), nessuna interpretazione di sensibilità. Le condizioni che possono dar luogo ad un risultato di Errore ("X") sono descritte nel Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**, Sezione 7 – Risoluzione dei problemi.

Nella compilazione dei rapporti dei risultati, è importante includere il metodo di analisi, il nome e la concentrazione del farmaco. Per quanto riguarda il regime terapeutico appropriato e le dosi, occorre consultare uno specialista di malattie polmonari e/o infettive esperto di tubercolosi.

La monoresistenza alla pirazinamide è poco comune e quindi nel caso di risultati imprevisti di resistenza, verificare che l'identificazione dell'isolato testato corrisponda a *M. tuberculosis*. Le direttive per le verifiche della purezza micobatterica sono reperibili nello standard CLSI M24.[2]

Compilazione dei rapporti dei risultati del **BACTEC MGIT** 960 PZA

Farmaco (concentrazione)	Risultati sistema BACTEC MGIT	Rapporto consigliato	Intervento
PZA (100 µg/mL)	Sensibile	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] ed è risultato sensibile.	Nessun intervento.
	Resistente	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] ed è risultato resistente.	Se l'isolato è monoresistente alla PZA, confermare che l'isolato analizzato sia una coltura pura di *Mycobacterium tuberculosis*.
	Errore "X"	Nessun rapporto.	Ripetere il test.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA non interpreta il grado di sensibilità dell'isolato analizzato. I risultati vengono riportati come sensibile o resistente.

Il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA può essere eseguito solo con uno strumento **BACTEC MGIT**. Non è possibile leggere manualmente i set PZA.

Usare solo colture pure di *M. tuberculosis*, in quanto le colture contaminate o contenenti ceppi multipli di micobatteri possono dare luogo ad artefatti e di conseguenza non devono essere analizzate. Non si consiglia l'analisi diretta da campioni clinici.

Prima di standardizzare le sospensioni preparate da terreni solidi, lasciarle riposare per il tempo stabilito. Le preparazioni per inoculo provenienti da terreni solidi devono essere confrontate visivamente ad uno standard di torbidità 0,5 McFarland, in quanto altrimenti potrebbero dar luogo a risultati non accurati o causare un errore del set AST.

Qualora si ometta di eseguire la diluizione 1:5 della sospensione di batteri, se indicata, per inoculare le provette di farmaco, è possibile incorrere in risultati non accurati.

Qualora si ometta di eseguire la diluizione 1:10 della sospensione di batteri per inoculare la provetta del Controllo di crescita, è possibile incorrere in risultati non accurati o causare un errore del set AST.

La mancata ricostituzione della pirazinamide con il volume corretto di acqua distillata/deionizzata sterile può dar luogo a risultati non accurati.

È importante che il contenuto delle provette inoculate venga mescolato bene, in quanto una miscelazione inadeguata può dar luogo a falsi risultati di resistenza.

Il mancato caricamento delle provette del set AST nel carrello secondo l'ordine appropriato può dar luogo a risultati non accurati. La selezione di una definizione errata di farmaci nel carrello del set può dar luogo a risultati non validi o non accurati.

Il caricamento sbagliato del set AST nello strumento può dar luogo ad una condizione sconosciuta che deve essere risolta entro otto ore. Se la condizione non viene risolta entro otto ore, il set AST deve essere scartato e predisposto nuovamente.

Il mancato impiego del supplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA nel set AST PZA può dar luogo ad artefatti. NON aggiungere il supplemento **BACTEC MGIT** 960 SIRE o il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** nel set AST PZA.

Il mancato impiego del terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA nel set AST PZA può dar luogo ad artefatti. NON sostituire il terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA con le provette di indicatore di crescita dei micobatteri **BBL MGIT** da 7 mL.

VALORI ATTESI

Con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA sono stati analizzati in tutto 118 isolati clinici di *M. tuberculosis* presso quattro centri in diverse aree geografiche. Nell'analisi sono stati inclusi isolati clinici freschi e isolati di subcolture da terreni di coltura liquidi e solidi. Sono stati eseguiti in tutto 228 test di sensibilità alla PZA (su terreno liquido e solido).

Durante la valutazione esterna del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA, è stato necessario ripetere la prova per nove test PZA da isolati clinici, a causa di contaminazione (sei isolati) o di eccessiva inoculo/errori di procedura (tre isolati).

Il tempo medio complessivo per raggiungere i risultati del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è di sette giorni, con un range da quattro a diciassette giorni. I dati sono illustrati nella Figura 1 (alla fine del foglietto illustrativo).

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Studi analitici

Range per inoculi AST su terreni liquidi e solidi

Terreni liquidi – Per preparare un set PZA da una provetta **MGIT** da 7 mL positiva, la procedura consigliata prevede l'impiego di un inoculo diretto nel Giorno 1 e nel Giorno 2 post-positività e di un inoculo diluito (1:5) dal Giorno 3 al Giorno 5 post-positività. Gli studi interni indicano che gli inoculi preparati dal Giorno 1 al giorno 5 da una provetta **MGIT** da 7 mL positiva rientrano in un range tra 2,0 x 10^4 e 7,5 x 10^6 CFU/mL.

Terreni solidi – Per preparare un set PZA da una crescita di terreni solidi (fino a 14 giorni dalla prima crescita osservata), la procedura consigliata prevede l'impiego di una diluizione 1:5 di una sospensione di batteri equivalente ad uno standard 0,5 McFarland. Gli studi interni indicano che gli inoculi preparati da coltura su terreno solido sono compresi in un range tra 2,1 x 10^5 e 3,9 x 10^6 CFU/mL.

Riproducibilità tra i lotti

La riproducibilità tra i lotti è stata valutata usando venticinque ceppi di *M. tuberculosis* (inclusi tre ceppi ATCC). Ogni ceppo è stato testato in triplicato con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA. Ogni replicato ha rappresentato una condizione di analisi separata, differenziata in base al lotto di farmaco PZA, al supplemento PZA e al terreno PZA utilizzati (tre lotti di ciascuno).

I risultati osservati sono stati confrontati con i risultati attesi. La riproducibilità complessiva del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è del 96,8%.

Valutazione con pannello di provocazione CDC

Le prestazioni del test di sensibilita **BACTEC MGIT** 960 PZA sono state valutate utilizzando un pannello di ceppi di provocazione ottenuto dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA. Il pannello era costituito da nove ceppi di *M. tuberculosis* con pattern di sensibilità accertati (con il **BACTEC** 460TB). Il pannello è stato testato in triplicato con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA. I risultati dei test **BACTEC MGIT** 960 PZA sono stati confrontati con i risultati attesi dei CDC. La concordanza complessiva con i risultati attesi dei CDC per il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è del 98,7%.

Valutazione clinica

Il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è stato valutato presso quattro centri in diverse aree geografiche, tra cui centri regionali di riferimento, laboratori di ospedali universitari, inclusi due centri fuori dagli USA. Il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è stato confrontato con il test di sensibilità eseguito con il metodo **BACTEC** 460TB PZA.

Riproducibilità del test

La riproducibilità del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è stata valutata presso i centri clinici utilizzando un pannello di cinque isolati qualificati. I risultati dei test **BACTEC MGIT** 960 PZA sono stati confrontati con i risultati attesi. La riproducibilità complessiva del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è del 94%.

Valutazione con pannello di provocazione CDC

Le prestazioni del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA sono state valutate presso ciascuno dei quattro centri clinici utilizzando un pannello di ceppi di provocazione ottenuto dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA. Il pannello era costituito da nove ceppi di *M. tuberculosis* con pattern di sensibilità accertati (con il **BACTEC** 460TB). Dei trentasei risultati PZA ottenuti con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA, trentatre sono stati concordi con i risultati attesi dei CDC. La concordanza percentuale calcolata con i risultati attesi dei CDC per il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA è del 91,7%.

Test di isolati clinici

Con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 PZA e con il test di sensibilità **BACTEC** 460TB PZA sono stati analizzati in tutto 118 isolati clinici di *M. tuberculosis*. Nell'analisi sono stati inclusi isolati clinici freschi e isolati di subcolture da terreni di coltura liquidi e solidi, L'analisi ha generato un totale di 228 risultati.

La Tabella 1 presenta i risultati ottenuti dai test di isolati clinici per la PZA alla concentrazione di 100 µg/mL provenienti dai terreni di coltura liquidi, da colture su terreno solido e da una combinazione di entrambe le colture.

Tabella 1 - Risultati di isolati clinici - Test di sensibilità BACTEC MGIT 960 PZA rispetto al test BACTEC 460TB di sensibilità

		Sistema BACTEC 460TB		Sistema BACTEC MGIT 960			
		Risultati PZA previsti		Risultati di sensibilità		Risultati di resistenza	
Terreno di provenienza	N. di test	S	R	N. di risultati concordi	% di accordo della categoria (95% CI)	N. di risultati concordi	% di accordo della categoria (95% CI)
LIQUIDO	112	89	23	88	98,9% (93,9–100)	22	95,7% (78,1–99,9)
SOLIDO	113*	90	23	88	97,8% (92,2–99,7)	20	87,0% (66,4–97,2)
TUTTI	225*	179	46	176	98,3% (95,2–99,7)	42	91,3% (79,2–97,6)

*Tre risultati **BACTEC** 460TB "borderline" non sono inclusi in questa tabella.

Tutti gli isolati con risultati del test **BACTEC MGIT** 960 PZA discordi sono stati testati con il test di sensibilità metodo **BACTEC** 460TB PZA presso due centri indipendenti. I ceppi con risultati discordi sono stati quelli in cui il risultato del test **BACTEC MGIT** 960 PZA era diverso dal risultato del test **BACTEC** 460TB PZA. I risultati "borderline" non sono stati inclusi nei calcoli delle prestazioni del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA.

Dei quattro isolati discordi PZA sensibili (S-**BACTEC MGIT** 960, R-**BACTEC** 460TB), uno è risultato sensibile presso entrambi i centri indipendenti e gli altri tre sono risultati resistenti presso entrambi i centri indipendenti. I tre isolati PZA resistenti discordi (R-**BACTEC MGIT** 960, S-**BACTEC** 460TB) sono risultati sensibili presso entrambi i centri indipendenti.

Due dei tre risultati PZA "borderline" **BACTEC** 460TB (S-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) sono risultati sensibili presso entrambi i centri indipendenti. Uno dei tre risultati PZA "borderline" **BACTEC** 460TB (R-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) è risultato sensibile presso un centro indipendente. L'altro centro indipendente ha ottenuto un risultato "borderline".

DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
245128	Kit **BACTEC MGIT** 960 PZA, confezione da 2 fiale di farmaco liofilizzato e sei supplementi PZA.
245115	Terreno **BACTEC MGIT** 960 PZA, scatola da 25 provette.

RIFERIMENTI

Vedere la sezione "References" nel testo inglese.

BD Kit BACTEC MGIT 960 PZA

Para o teste da sensibilidade anti-micobacteriana do *Mycobacterium tuberculosis*

Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit (conjunto **BACTEC MGIT** 960 PZA) é um procedimento qualitativo rápido para o teste da susceptibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* em cultura, à pirazinamida (PZA). O **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit é utilizado com o sistema **BACTEC MGIT**.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

O teste da sensibilidade anti-micobacteriana é importante para o tratamento adequado de doentes com tuberculose. O tratamento da tuberculose faz-se habitualmente recorrendo a um regime farmacológico múltiplo, que inclui o fármaco anti-micobacteriano pirazinamida. É importante que os fármacos anti-micobacterianos prescritos demonstrem uma actividade apropriada contra o *Mycobacterium tuberculosis*, ou seja, que exista susceptibilidade do isolado ao fármaco.

O *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente a fármacos (MDR-TB) tornou-se recentemente num grave problema de saúde pública.[1] A resistência a qualquer dos principais fármacos, incluindo a pirazinamida, tornou o tratamento desta doença mais difícil e mais caro. A rápida detecção destes isolados resistentes é essencial para um tratamento eficaz do doente.

Existem dois métodos que têm sido amplamente usados no teste da sensibilidade anti-micobacteriana. O primeiro método, conhecido como o Método de Proporção,[2] utiliza Middlebrook and Cohn 7H10 Agar (Agar de Middlebrook e Cohn 7H10). Compara a contagem de colónias entre meios contendo fármaco e meios isentos de fármaco. O teste da pirazinamida exige que se façam algumas modificações aos métodos genéricos, porque este fármaco só é activo *in vitro* com valores de pH inferiores.[3] Foi desenvolvida uma modificação do método de proporção usando um meio de agar de 7H10 com um pH de 5,5 e uma concentração de fármaco de 25-50 µg/mL.[4] Uma das limitações deste método reside no facto de a um pH de 5,5 muitos dos isolados de *M. tuberculosis* não se desenvolvem ou apresentam um desenvolvimento fraco. Os métodos baseados em Agar, como o método de proporção em agar, não se revelaram adequados para o teste da sensibilidade à PZA, dada a incapacidade que muitos isolados apresentam para se desenvolver quando o agar é acidificado para o teste da PZA.

O segundo método, conhecido como o método de sensibilidade radiométrica **BACTEC** 460TB,[5] baseia-se na produção de dióxido de carbono radioactivo marcado com ^{14}C por parte das micobactérias em desenvolvimento, o que se manifesta por um aumento do índice de crescimento no sistema. Foi desenvolvida uma modificação do método de sensibilidade **BACTEC** 460TB recorrendo a um meio radiométrico de 7H12 modificado, o **BACTEC** PZA Test Medium (Meio de Teste **BACTEC** PZA), que apresenta um pH reduzido, de 6,0.[6] Com este valor de pH, é possível determinar a actividade da PZA contra as micobactérias sem inibir o crescimento da maioria dos isolados de *M. tuberculosis*. O teste de sensibilidade **BACTEC** 460TB PZA utiliza uma concentração do fármaco pirazinamida de 100 µg/mL. O teste da sensibilidade no sistema **BACTEC** 460TB revelou-se adequado, considerando-se actualmente este método como o padrão de referência para teste da sensibilidade à PZA. O Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, anteriormente NCCLS) continua a recomendar que o procedimento MOP inclua duas concentrações dos fármacos primários para teste, excepto a rifampina.[2]

A utilização do **BACTEC MGIT** System em combinação com o **BACTEC MGIT** 960 PZA kit consiste num método não radiométrico para determinar a sensibilidade anti-micobacteriana à PZA. O **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit foi desenvolvido para permitir o teste da sensibilidade com uma concentração de pirazinamida de 100 µg/mL. Esta concentração correlaciona-se com a concentração usada no **BACTEC** 460TB System.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium (Meio **BACTEC MGIT** 960 PZA) consiste num tubo contendo um Middlebrook 7H9 Broth (Caldo de Carne de Middlebrook 7H9) modificado, que suporta o crescimento e detecção de micobactérias a um pH reduzido, de 5,9. O **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium tube (tubo do Meio **BACTEC MGIT** 960 PZA) contém um composto fluorescente embebido em silicone, no fundo de um tubo de 16 x 100 mm com base redonda. O composto fluorescente é sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. A concentração inicial de oxigénio dissolvido atenua a emissão proveniente do composto, tornando possível detectar um reduzido grau de fluorescência. Subsequentemente, microrganismos com proliferação e respiração activa consomem o oxigénio, o que permite que o composto desenvolva fluorescência.

O **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit é um teste qualitativo de 4 a 21 dias. O teste baseia-se no crescimento de isolados de *M. tuberculosis* num tubo contendo fármaco, que é comparado com um tubo isento de fármaco (Controlo do Crescimento). O instrumento **BACTEC MGIT** monitoriza os tubos relativamente a um aumento da fluorescência. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo de Controlo de Crescimento, é usada pelo instrumento para determinar os resultados da sensibilidade.

O instrumento **BACTEC MGIT** interpreta estes resultados automaticamente e reporta um resultado de sensível ou resistente.

REAGENTES

O **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium tube contém 110 µL de indicador fluorescente e 7 mL de caldo de carne com PZA. O indicador contém Tris 4,7-difenil-1, 10 fenantrolina ruténio cloreto pentahidrato numa base de borracha de silicone. Os tubos são tapados com uma tampa de polipropileno. O pH é ajustado para 5,9.

Fórmula Aproximada* Por Litro de Água Purificada

Caldo de Carne de Middlebrook 7H9 Modificado .....5,9 g

Peptona de caseína .....1,25 g

O **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit contém dois frascos de pirazinamida liofilizada e seis frascos de Suplemento de PZA.

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Pirazinamida.....20 000 µg

O **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement (Suplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA) contém 15 mL de enriquecimento

Fórmula Aproximada* Por Litro de Água Purificada

Albumina bovina .....50,0 g	Catalase .....0,03 g
Dextrose .....20,0 g	Ácido Oleico .....0,1 g
Estearato de polioxietileno (POES) .....1,1 g	

**Ajustado e/ou suplementado conforme necessário para cumprir os critérios de desempenho.*

Conservação e reconstituição dos reagentes:

BACTEC MGIT 960 PZA Medium - Após recepção, conservar entre 2 e 25°C. NÃO CONGELAR. O caldo de carne deverá ter um aspecto transparente e incolor. Não usar se estiver turvo. Minimizar a exposição à luz. Os tubos conservados conforme rotulados antes de usar, podem ser inoculados até ao final prazo de validade.

BACTEC MGIT 960 PZA Drug vials (Frascos de Fármaco **BACTEC MGIT** 960 PZA) - Após recepção, conservar os frascos de fármaco liofilizado entre 2 e 8°C. Após reconstituição, a solução antibiótica pode ser congelada e conservada a -20°C ou menos durante

um período máximo de seis meses, não excedendo o prazo de validade original. Depois de descongelar, usar de imediato. Descartar o que não se utilizar.

BACTEC MGIT 960 PZA Supplement - Após recepção, conservar no escuro entre 2 e 8°C. Evitar congelar ou aquecer demasiado. Abrir e usar antes do final do prazo de validade. Minimizar a exposição à luz.

Instruções de Utilização:

Reconstitua cada **BACTEC MGIT** 960 PZA lyophilized drug vial (frasco de fármaco liofilizado de **BACTEC MGIT** 960 PZA) com **2,5 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 8000 µg/mL.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES: Para uso em Diagnóstico *in-vitro*.

AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSA: Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"[7-10] e as linhas de orientação da instituição.

O trabalho com crescimento de *M. tuberculosis* em cultura requer práticas de Biossegurança de Nível 3 (BSL), equipamento e instalações de contenção.

Leia e siga as instruções contidas em todos os folhetos informativos apropriados, incluindo o do **BBL MGIT** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias **MGIT BBL** de 7 mL).

Antes usar, o utilizador deverá examinar os tubos e frascos relativamente a sinais de contaminação ou danos. Rejeitar qualquer tubo ou frasco que pareça inadequado. Tubos que caiam deverão ser analisados cuidadosamente. Se forem observados danos, o tubo deverá ser descartado.

Em caso de quebra do tubo: 1) Fechar as gavetas do instrumento; 2) Desligar o instrumento; 3) Desocupar a área de imediato; 4) Consultar as normas da instituição/CDC. Um tubo inoculado que apresente fugas ou se encontre partido pode produzir aerossóis de micobactérias; o frasco deverá ser manipulado de forma apropriada.

Submeter todos os tubos **MGIT** inoculados ao autoclave antes de proceder ao seu descarte.

PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Todas as preparações que se descrevem em baixo devem ser provenientes de culturas puras de *M. tuberculosis*. O laboratório deverá confirmar, através de técnicas de identificação adequadas, que o isolado a testar consiste numa cultura pura de *M. tuberculosis*.

O inóculo pode ser preparado a partir de meio sólido ou de um tubo positivo **BACTEC MGIT** de 7 mL. Para além disso, as culturas desenvolvidas em meios líquidos e em meios sólidos podem ser utilizadas para preparar um tubo de sementeira **MGIT**, o qual poderá ser utilizado para preparar o inóculo. Cada uma destas opções é descrita em seguida.

Preparação do Inóculo a partir de Meios Sólidos:

NOTA: É importante preparar o inóculo de acordo com as instruções que se seguem, para obter a concentração de microrganismos adequada para o teste de sensibilidade.

1. Adicionar 4 mL de **BBL** Middlebrook 7H9 Broth (ou **BBL MGIT** broth) a um tubo estéril de 16,5 x 128 mm com tampa, contendo 8 a 10 esferas de vidro.
2. Raspar, usando uma ansa estéril, o máximo número de colónias possível, com um período de crescimento inferior a 14 dias, tentando não retirar o meio sólido. Suspender as colónias em Caldo de Middlebrook 7H9 Broth.
3. Levar a suspensão ao misturador automático durante 2 a 3 minutos para desintegrar os aglomerados de maior dimensão. A turvação da suspensão deverá ser superior à de um padrão 1,0 de McFarland.
4. Deixar a suspensão repousar durante 20 minutos, sem perturbação.
5. Transferir o líquido do sobrenadante para outro tubo estéril de 16,5 x 128 mm com tampa (evitar transferir qualquer parte do sedimento) e deixar assentar mais 15 minutos.
6. Transferir o líquido sobrenadante (deverá ter um aspecto homogéneo, isento de aglomerados) para um terceiro tubo estéril de 16,5 x 128 mm. **NOTA:** Neste passo, a suspensão de microrganismos deverá ser superior à de um padrão 0,5 de McFarland.
7. Ajustar a suspensão para um padrão 0,5 de McFarland, recorrendo a comparação com um padrão de turvação 0,5 de McFarland. Não ajuste abaixo de um padrão 0,5 de McFarland.
8. Diluir 1 mL da suspensão ajustada em 4 mL de solução salina estéril (diluição a 1:5). Utilizar isto como o inóculo AST e prosseguir para "Procedimento de Inoculação para o Teste de Sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA".

Preparação do Inóculo a partir de um Tubo Positivo BACTEC MGIT de 7 mL:

1. O primeiro dia de um tubo **BACTEC MGIT** positivo no instrumento é considerado como Dia 0.
2. Para a preparação do inóculo de teste, deverá usar-se um tubo positivo **MGIT** de 7 mL desde o dia seguinte ao primeiro dia de resultado positivo no instrumento **BACTEC MGIT** (Dia 1) e até ao quinto dia (Dia 5), inclusivé, após o instrumento revelar positividade. Um tubo que seja positivo há mais de cinco dias deve ser submetido a uma repicagem para um tubo **MGIT** de 7 mL novo contendo **BACTEC MGIT** Growth Supplement (Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT**), e testado no instrumento **BACTEC MGIT** até ser positivo, devendo ser utilizado do primeiro ao quinto dia após o início da positividade. Consulte "Preparação de um Tubo de Sementeira **MGIT** a partir de Meio Líquido".
3. Se o tubo for positivo no Dia 1 ou Dia 2, não é necessária diluição. Utilizar isto como o inóculo AST e prosseguir para "Procedimento de Inoculação para o Teste de Sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA".
4. Se o tubo for positivo do Dia 3, Dia 4 ou Dia 5, diluir 1 mL do caldo positivo em 4 mL de solução salina estéril (diluição a 1:5). Homogeneizar bem o tubo. Utilizar isto como o inóculo AST e prosseguir para "Procedimento de Inoculação para o Teste de Sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA".

Preparação de um Tubo de Sementeira MGIT a partir de Meio Líquido

1. Homogeneizar o tubo através de inversão ou com vortex.
2. Diluir a 1:100 com adição de 0,1 mL de cultura a 10 mL de Meio Líquido **BBL** Middlebrook 7H9 ou Meio Líquido **BBL MGIT**. Homogeneizar bem.
3. Adicionar 0,5 mL desta suspensão a um tubo **MGIT** de 7 mL suplementado com 0,8 mL de Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT**.
4. Tapar firmemente e homogeneizar suavemente com 2 a 3 inversões.
5. Introduzir o tubo num instrumento **BACTEC MGIT** e efectuar o teste até obter um positivo.

   NOTA: O tempo até à positividade **deve ser** ≥ 4 dias para a utilização como inóculo AST. Se o tubo ficar positivo em < 4 dias, regressar ao passo 1 e preparar um novo tubo de sementeira.
6. Este tubo poderá então ser utilizado dentro de 1 a 5 dias após obter a positividade. Consulte "Preparação do Inóculo a partir de um Tubo Positivo **BACTEC MGIT** de 7 mL" acima.

Preparação de um Tubo de Sementeira MGIT a partir de Meio Sólido

1. Raspar o crescimento de um tubo inclinado com uma ansa estéril e adicionar a um tubo **MGIT** de 7 mL suplementado com 0,8 mL de Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT**.
2. Tapar firmemente e homogeneizar suavemente com 2 a 3 inversões.
3. Introduzir o tubo num aparelho **BACTEC MGIT** e efectuar o teste até obter um positivo.

   NOTA: O tempo até à positividade **deve ser** ≥ 4 dias para a utilização como inóculo AST. Se o tubo ficar positivo em < 4 dias, regressar ao passo 1 e preparar um novo tubo de sementeira.
4. Este tubo poderá então ser utilizado dentro de 1 a 5 dias após obter a positividade. Consulte "Preparação do Inóculo a partir de um Tubo Positivo **BACTEC MGIT** de 7 mL" acima.

PROCEDIMENTO

Material Fornecido: BACTEC MGIT 960 PZA Kit contendo dois frascos de cada fármaco liofilizado e seis frascos de Suplemento PZA (aproximadamente 50 testes por conjunto).

Material Necessário mas Não Fornecido: BACTEC MGIT 960 PZA Medium (25 tubos por caixa), meios de cultura auxiliares, reagentes, organismos de controlo da qualidade e equipamento de laboratório necessário para este procedimento.

Procedimento de Inoculação para o Teste de Sensibilidade BACTEC MGIT 960 PZA:

As considerações importantes quando se prepara o Conjunto PZA AST consistem na reconstituição adequada do fármaco liofilizado, utilização de uma cultura pura e diluição adequada do microrganismo para o tubo de Controlo do Crescimento e PZA. É importante adicionar o fármaco apenas ao **MGIT** tube (tubo **MGIT**) correspondente, rotulado "PZA." Utilizar apenas o **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement fornecido com o conjunto e os tubos de **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium quando se efectuar o conjunto PZA AST.

1. Rotular dois tubos de 7 mL **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium de 7 mL para cada isolado de teste. Rotular um como CC (Controlo de Crescimento) e um como PZA. Colocar os tubos na sequência correcta no conjunto de transporte de dois tubos AST (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Em condições assépticas, juntar 0,8 mL de **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement a cada tubo.
3. Em condições assépticas e utilizando uma micropipeta, pipetar 100 µL da solução de fármaco de 8000 µg/mL de **BACTEC MGIT** 960 PZA para o tubo **MGIT** PZA adequadamente rotulado. Não se deverá juntar qualquer solução de fármaco PZA ao tubo rotulado **MGIT** GC.

Medicamento	Concentração do Fármaco após Reconstituição*	Volume Adicionado aos Tubos MGIT para Teste	Concentração Final nos Tubos MGIT
MGIT PZA	8000 µg/mL	100 µL	100 µg/mL*

*PZA devem ser reconstituída utilizando **2,5 mL** de água estéril/desionizada para atingir a concentração indicada.

4. **Preparação e inoculação do tubo de Controlo do Crescimento:** Em condições assépticas, pipetar 0,5 mL do inóculo AST (consultar "PREPARAÇÃO DO INÓCULO") para 4,5 mL de solução salina estéril para preparar a suspensão de Controlo de Crescimento a **1:10**. Homogeneizar a suspensão de Controlo do Crescimento por completo. Inocular 0,5 mL da suspensão de Controlo do Crescimento a **1:10** no tubo **MGIT** rotulado "GC."

   NOTA: é importante utilizar uma diluição a **1:10** preparada adequadamente para o tubo "GC", visando garantir resultados de AST rigorosos e evitar erros no conjunto AST PZA.
5. **Inoculação do tubo contendo fármaco:** Em condições assépticas, pipetar 0,5 mL do inóculo AST (consultar "PREPARAÇÃO DO INÓCULO") para o tubo **MGIT** rotulado "PZA".
6. Voltar a tapar os tubos firmemente. Homogeneizar os tubos por completo através de inversão suave, três a quatro vezes.
7. Colocar o conjunto PZA no instrumento **BACTEC MGIT** usando a característica de entrada do conjunto AST (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**). Assegurar-se de que o tubo de Controlo de Crescimento se encontra na primeira posição do tubo à esquerda. Seleccionar PZA como o fármaco na definição de transportador do conjunto de tubos AST 2 quando se efectuar a entrada do conjunto AST.
8. Espalhar 0,1 mL da suspensão do organismo num placa de **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (Agar de Soja **Trypticase** com Sangue Ovino a 5%) (TSA II). Fechar num saco de plástico. Incubar entre 35 e 37ºC.
9. Analisar a placa de agar de sangue decorridas 48 horas relativamente à presença de contaminação bacteriana. Se o agar do sangue não apresentar crescimento, prosseguir com o teste PZA. Se a placa de agar de sangue apresentar crescimento, descartar o conjunto PZA (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**) e repetir o teste com uma cultura pura de *Mycobacterium tuberculosis*.

Controlo de Qualidade do Utilizador: Após a recepção de uma nova remessa ou número de lote de frascos do **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit ou do **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium, recomenda-se o teste dos microrganismos de controlo que se enumeram de seguida. O microrganismo de controlo deve ser uma cultura pura, e a cultura deve ser preparada de acordo com as instruções de "PREPARAÇÃO DO INÓCULO".

O Conjunto AST de controlo de qualidade (CQ) deve ser preparado de acordo com as instruções do "Procedimento de Inoculação para o **BACTEC MGIT** 960 PZA Susceptiblity Test (Teste de Sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA)". As considerações importantes quando se prepara o Conjunto de CQ AST consistem na reconstituição adequada do fármaco liofilizado, utilização de uma cultura pura e diluição adequada do microrganismo de CQ para os tubos de Controlo do Crescimento e PZA. É importante adicionar o fármaco apenas ao tubo **MGIT** correspondente, rotulado "PZA."

Deverá usar-se o mesmo microrganismo de controlo como grupo de CQ semanalmente, quando se efectuar o teste de sensibilidade. A observação de resultados adequados, conforme se mostrado de seguida, decorridos 4 a 20 dias, indica que os reagentes do **BACTEC MGIT** 960 PZA estão prontos a ser usados no teste do isolado do doente.

Se não se observarem resultados adequados, não reportar os resultados do doente. Repetir o CQ e quaisquer isolados do doente afectados pela falha inicial do CQ. Se a repetição do CQ não apresentar o desempenho previsto, não participar os resultados do doente. Não utilizar o produto até ter entrado em contacto com o representante local da BD.

Estirpes	CC	MGIT PZA
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensível

Durante a avaliação externa do **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit, o período de tempo médio até à obtenção do resultado para o microrganismo de controlo foi de sete dias, com um intervalo de quatro a onze dias. As causas mais frequentes para falhas do CQ durante a avaliação externa consistiram em Conjuntos PZA excessivamente inoculados e culturas de CQ contaminadas.

RESULTADOS

O instrumento **BACTEC MGIT** irá monitorizar os conjuntos de AST até que seja feita uma determinação de sensível ou resistente. Depois do teste do conjunto se concluir, os resultados serão participados pelo instrumento **BACTEC MGIT** (consultar o Manual do

Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**). O instrumento **BACTEC MGIT** irá reportar um resultado do Conjunto AST como um Erro ("X"), ausência de interpretação de sensibilidade, quando ocorrerem determinadas condições que possam afectar os resultados do teste. As condições que poderão dar origem a um resultado de Erro ("X") estão descritas na Secção 7 - Resolução de Problemas do Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**.

É importante incluir o método de teste, nome do fármaco e sua concentração quando se reportarem os resultados. O especialista em Doenças Infecciosas e/ou Pulmonares a cargo do controlo da TB deve ser consultado relativamente ao regime e posologias terapêuticas adequadas.

A mono-resistência a pirazinamida é rara, pelo que no caso de serem obtidos resultados de resistência inesperados, deverá confirmar-se a pureza e identificação do isolado testado como *M. tuberculosis*. As normas para as verificações da pureza micobacteriana podem ser encontradas no padrão M24 do CLSI.[2]

Relatório de resultados do **BACTEC MGIT** 960 PZA

Fármaco (concentração)	Resultado no sistema BACTEC MGIT	Relatório Recomendado	Acção
PZA (100 µg/mL)	Sensível	O isolado foi testado com o sistema **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] e o resultado é sensível.	Nenhuma acção.
	Resistente	O isolado foi testado com o sistema **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] e o resultado é resistente.	Se o isolado for mono-resistente a PZA, confirme que o isolado testado consiste numa cultura pura de *Mycobacterium tuberculosis*.
	Erro "X"	Nenhum relatório.	Repita o teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA não interpreta o grau de sensibilidade do isolado que está a ser testado. Os resultados são reportados como sensível ou resistente.

O teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA só pode ser efectuado utilizando um instrumento **BACTEC MGIT**. Os Conjuntos PZA não podem ser lidos manualmente.

Utilizar exclusivamente culturas puras de *M. tuberculosis*. Culturas contaminadas ou contendo estirpes múltiplas de micobactérias podem dar origem a resultados errados e não devem ser testadas. Não se recomendam testes directos a partir de amostras clínicas.

Deverá permitir-se que suspensões feitas a partir de meios sólidos assentem durante os períodos de tempo prescritos antes da padronização. Preparações de inóculo feitas a partir de meios sólidos devem ser comparadas visualmente com um padrão de turvação de 0,5 de McFarland; se tal não for realizado, podem obter-se resultados imprecisos ou provocar-se um erro de Conjunto AST.

A não utilização de uma diluição de 1:5 da suspensão do microrganismo, quando indicado, para a inoculação dos tubos contendo o fármaco poderá fornecer resultados incorrectos.

A incapacidade de utilização de uma diluição a 1:10 da suspensão do microrganismo para inoculação do tubo de Controlo de Crescimento pode dar origem a resultados imprecisos ou a um erro do Conjunto AST.

A incapacidade de reconstituição do fármaco PZA com o volume adequado de água destilada/desionizada estéril pode dar origem a resultados imprecisos.

A homogeneização total dos tubos inoculados é importante. A não homogeneização adequada pode dar origem a resultados de falsa resistência.

A incapacidade de carregar os tubos do conjunto AST no Transportador do Conjunto AST na sequência adequado pode dar origem a resultados imprecisos. A incapacidade de seleccionar a definição adequada do fármaco no transportador do conjunto pode dar origem a resultados inválidos ou imprecisos.

A incapacidade de carregar correctamente os tubos do conjunto AST no instrumento irá dar origem a uma situação anónima que tem que ser resolvida no prazo de oito horas. Se esta situação não for resolvida no prazo de oito horas, o Conjunto AST tem que ser eliminado e criado novamente.

A incapacidade de usar o **BACTEC MGIT** 960 PZA Supplement no conjunto PZA AST pode dar origem a resultados inexactos. NÃO adicionar **BACTEC MGIT** 960 SIRE Supplement (Suplemento **MGIT** 960 SIRE **BACTEC**) ou **BACTEC MGIT** Growth Supplement ao conjunto AST PZA.

A incapacidade de usar o Meio **BACTEC MGIT** 960 PZA no conjunto PZA AST pode dar origem a resultados inexactos. NÃO substituir os **BBL MGIT** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tubes (Tubos Indicadores do Crescimento de Micobactérias **MGIT BBL** de 7 mL) por **BACTEC MGIT** 960 PZA Medium.

VALORES ESPERADOS

Testou-se um total de 118 isolados clínicos de *M. tuberculosis* com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA em quatro locais clínicos com localizações geográficas diversas. Os testes incluíram isolados clínicos frescos e em repicagem, provenientes de culturas líquidas e sólidas. Foi efectuado um total de 228 testes de sensibilidade PZA (líquidos e sólidos).

Durante a avaliação externa do **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit, registaram-se nove testes PZA de isolados clínicos que necessitaram de repetição do teste devido a contaminação (seis isolados) ou inoculação excessiva/erros de procedimento (três isolados).

O período médio de tempo até à obtenção do resultado para o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA é de sete dias, com um intervalo de quatro a dezassete dias. Os dados estão apresentados na Figura 1, no fim do folheto informativo.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Estudos Analíticos

Intervalos de Inóculo AST em Meio Líquido e Sólido:

Meio líquido - O procedimento recomendado para a preparação de um Conjunto PZA de um tubo **MGIT** de 7 mL positivo utiliza um inóculo directo no Dia 1 e Dia 2 pós-positividade e um inóculo diluído (1:5) no Dia 3 a Dia 5 pós-positividade. Estudos internos mostram que inóculos preparados a partir de um tubo **MGIT** de 7 mL positivo do Dia 1 a Dia 5 variam entre 2,0 x 10^4 e 7,5 x 10^6 UFC/mL.

Meio sólido - O procedimento recomendado para a preparação de um Conjunto PZA a partir de crescimento em meio sólido (até 14 dias depois da observação do primeiro crescimento visível) utiliza uma diluição a 1:5 de suspensão de microrganismos equivalente a um padrão 0,5 de McFarland. Estudos internos mostram que inóculos preparados a partir de um meio de cultura sólido variam entre 2,1 x 10^5 e 3,9 x 10^6 UFC/mL.

Reprodutibilidade de Lote:

A reprodutibilidade de lote foi avaliada utilizando 25 estirpes de *M. tuberculosis* (incluindo três estirpes ATCC). Cada estirpe foi testada em triplicado com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA. Cada réplica representou uma condição de teste separada, diferenciada por lote de fármaco PZA, suplemento PZA e meio PZA utilizado (três lotes cada).

Os resultados observados foram comparados com os resultados esperados. A reprodutibilidade global para o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA é de 96,8%.

Teste do Painel de Provocação do CDC:

O desempenho do teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA foi avaliado utilizando um painel de estirpes de provocação, obtidas junto do Centers for Disease Control and Prevention - CDC (Centro de Controlo e Prevenção das Doenças dos EUA) em Atlanta, GA, EUA. O painel foi constituído por 9 estirpes de *M. tuberculosis* com padrões de sensibilidade conhecidos (utilizando o **BACTEC** 460TB). O painel foi testado em triplicado com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA. Os resultados do teste **BACTEC MGIT** 960 PZA foram comparados com os resultados esperados pelo CDC. A concordância global com os resultados esperados pelo CDC para o teste de sensibilidade BACTEC **MGIT** 960 PZA é de 98,7%.

Avaliação Clínica

O teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA foi avaliado em quatro locais clínicos com localizações geográficas diversas, visando incluir centros regionais de referência e laboratórios baseados em hospitais universitários, incluindo dois locais ex-EUA. O teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA foi comparado com o método de teste de sensibilidade **BACTEC** 460TB PZA.

Teste de Reprodutibilidade:

A reprodutibilidade do teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA foi avaliada nos locais clínicos utilizando um painel de cinco estripes qualificadas. Os resultados do teste **BACTEC MGIT** 960 PZA foram comparados com os resultados esperados. A reprodutibilidade global para o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA é de 94%.

Teste do Painel de Provocação do CDC:

O desempenho do teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA foi avaliado em cada um dos quatro locais clínicos utilizando um painel de estirpes de provocação, obtidas junto do Centers for Disease Control and Prevention - CDC (Centro de Controlo e Prevenção das Doenças dos EUA) em Atlanta, GA, EUA. The painel foi constituído por 9 estirpes de *M. tuberculosis* com padrões de sensibilidade conhecidos (utilizando o **BACTEC** 460TB). Dos 36 resultados de PZA reunidos com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA, 33 apresentaram concordância com os resultados esperados pelo CDC. A concordância percentual calculada com os resultados esperados pelo CDC para o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA é de 91,7%.

Teste de Isolados Clínicos:

Testou-se um total de 118 isolados clínicos de *M. tuberculosis* com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 PZA e com o teste de sensibilidade **BACTEC** 460TB PZA. Os testes incluíram isolados clínicos frescos e em repicagem, provenientes de culturas líquidas e sólidas. Foi obtido um total de 228 resultados de teste.

No Quadro 1 apresentam-se os resultados dos testes dos isolados clínicos para o fármaco PZA a 100 µg/mL proveniente de culturas líquidas, culturas sólidas e combinação dos dois tipos de culturas.

Quadro 1: Resultados dos Isolados Clínicos - teste de sensibilidade BACTEC MGIT 960 PZA comparado com o teste de sensibilidade BACTEC 460TB PZA.

		BACTEC 460TB System		**BACTEC MGIT 960 System**			
		Resultados Esperados de PZA		**Resultados de Sensível**		**Resultados de Resistente**	
Origem	**# Testes**	**S**	**R**	**% Concordância**	**# concordantes na Categoria (IC 95%)**	**% Concordância**	**# concordantes na Categoria (IC 95%)**
LÍQUIDO	112	89	23	88	98,9% (93,9-100)	22	95,7% (78,1-99,9)
SÓLIDO	113*	90	23	88	97,8% (92,2-99.7)	20	87,0% 66,4-97,2)
TODOS	225*	179	46	176	98,3% (95,2-99,7)	42	91,3% (79,2-97,6)

*Neste quadro, não se incluem três resultados limiares no **BACTEC** 460TB.

Todos os isolados com resultados discordantes no teste **BACTEC MGIT** 960 PZA foram testados utilizando o teste de sensibilidade **BACTEC** 460TB PZA em dois locais independentes. Os resultados discordantes foram referentes às estirpes onde o resultado do teste **BACTEC MGIT** 960 PZA diferiu do resultado do teste **BACTEC** 460TB PZA. Os resultados limiares não estão incluídos nos cálculos de desempenho para o **BACTEC MGIT** 960 PZA Kit.

Dos quatro isolados sensíveis a PZA discordantes (S- **BACTEC MGIT** 960, R- **BACTEC** 460TB), um apresentou resultados de sensível nos dois locais independentes e os outros três apresentaram resultados de resistente nos dois locais independentes. Dos três isolados resistentes a PZA discordantes (R- **BACTEC MGIT** 960, S- **BACTEC** 460TB), todos apresentaram resultados de sensível nos dois locais independentes.

Dois dos três resultados limiares a PZA no **BACTEC** 460TB (S- **BACTEC MGIT** 960, L- **BACTEC** 460TB) apresentaram resultados de sensível nos dois locais independentes. Um dos três resultados limiares a PZA no **BACTEC** 460TB (R- **BACTEC MGIT** 960, L- **BACTEC** 460TB) teve um local independente a determinar um resultado de sensível. O outro local independente determinou um resultado limiar.

DISPONIBILIDADE

N.° de Cat.	**Descrição**
245128	Conjunto **BACTEC MGIT** 960 PZA, caixa de 2 frascos de fármaco liofilizado e 6 Suplementos de PZA.
245115	Meio **BACTEC MGIT** 960 PZA, caixa de 25 tubos.

BIBLIOGRAFIA : Consulte "References" no texto em Inglês.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Importado e Distribuído no Brasil por:
Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda
Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil
CNPJ 21.551.379/0013-31
Serviço de Suporte Tecnico (11) 5185-9961
Registro ANVISA nº 10033430448 (Conjunto **BACTEC MGIT** 960 PZA)
Registro ANVISA nº 10033430381 (Meio **BACTEC MGIT** 960 PZA)
Centro de Relacionamento com o cliente: 0800 0555 654

BD Kit BACTEC MGIT 960 PZA

Para el análisis de sensibilidad antimicobacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*

Español

USO PREVISTO

El kit **BACTEC MGIT** 960 PZA es un procedimiento cualitativo rápido para el análisis de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenida en cultivo, a pirazinamida. El kit **BACTEC MGIT** 960 PZA se utiliza con el sistema **BACTEC MGIT**.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El análisis de sensibilidad antimicobacteriana es útil para el tratamiento adecuado de pacientes con tuberculosis. El tratamiento de la tuberculosis se realiza mediante polifarmacoterapia que incluye el antimicobacteriano pirazinamida. Es importante que los antibióticos antimicobacterianos recetados presenten la actividad apropiada frente a *Mycobacterium tuberculosis*, es decir, que la cepa aislada sea sensible al antibiótico.

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (TB-MR) se han convertido últimamente en un problema grave para la salud pública[1]. La resistencia a cualquiera de los antibióticos principales, incluida la pirazinamida, hace que la enfermedad sea más difícil y costosa de tratar. La rápida detección de estas cepas aisladas resistentes es esencial para proporcionar un tratamiento eficaz al paciente.

Para el análisis de la sensibilidad antimicobacteriana se han utilizado generalmente dos métodos. El primer método, conocido como método de las proporciones[2], utiliza el agar Middlebrook y Cohn 7H10. Este método compara el número de colonias en medios con y sin antibiótico. El análisis de pirazinamida requiere cierta modificación de los métodos generales, ya que el antibiótico es activo *in vitro* sólo con valores de pH bajos[3]. Se desarrolló una modificación del método de las proporciones utilizando un medio de agar 7H10 a pH 5,5, con una concentración de antibiótico de 25 µg/mL a 50 µg/mL[4]. Una limitación del método es que con un pH de 5,5, muchas cepas aisladas de *M. tuberculosis* no crecen o crecen muy poco. Los métodos que utilizan agar, como el método de las proporciones, no han demostrado ser satisfactorios en el análisis de sensibilidad a PZA debido a que muchas cepas aisladas no crecen cuando el agar ha sido acidificado para el análisis de PZA.

El segundo método, conocido como método de sensibilidad radiométrica **BACTEC** 460TB[5], se basa en la producción de dióxido de carbono marcado con ^{14}C radiactivo por la micobacteria en crecimiento, que se manifiesta por un aumento del índice de crecimiento en el sistema. Se desarrolló una modificación del método de sensibilidad **BACTEC** 460TB utilizando un medio radiométrico 7H12 modificado, el medio para análisis de PZA **BACTEC**, con un pH bajo de 6,0[6]. A este pH, la actividad de la PZA frente a la micobacteria puede determinarse sin inhibición del crecimiento de la mayoría de las cepas aisladas de *M. tuberculosis*. El análisis de sensibilidad **BACTEC** 460TB PZA utiliza una concentración del antibiótico pirazinamida de 100 µg/mL. El análisis de sensibilidad en el sistema **BACTEC** 460TB ha demostrado ser satisfactorio y actualmente se considera el método de referencia para el análisis de sensibilidad a PZA. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) sigue recomendando que el procedimiento del análisis MP incluya dos concentraciones de los principales antibióticos analizados, con la excepción de rifampicina[2].

El uso del instrumento **BACTEC MGIT** en combinación con el kit **BACTEC MGIT** 960 PZA es un método no radiométrico para la determinación de la sensibilidad antimicobacteriana a PZA. El kit **BACTEC MGIT** 960 PZA se ha desarrollado para permitir la realización del análisis de sensibilidad a una concentración de pirazinamida de 100 µg/mL. Esta concentración muestra una correlación con la concentración utilizada en el sistema **BACTEC** 460TB.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El medio **BACTEC MGIT** 960 PZA es un tubo que contiene un caldo Middlebrook 7H9, el cual permite el crecimiento y la detección de micobacterias a un pH bajo de 5,9. El tubo de medio **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene un compuesto fluorescente incluido en silicona que se encuentra en la parte inferior de un tubo de 16 x 100 mm de fondo redondo. El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial de oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto, por lo que se detecta poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos, al respirar y crecer activamente, consumen el oxígeno, lo cual permite la fluorescencia del compuesto.

El kit **BACTEC MGIT** 960 PZA es un análisis cualitativo de 4 a 21 días. El análisis se basa en la comparación del crecimiento de la cepa aislada de *M. tuberculosis* en un tubo que contiene antibiótico con el crecimiento en un tubo sin antibiótico (control de crecimiento). El instrumento **BACTEC MGIT** controla los tubos para detectar un aumento de su fluorescencia. El instrumento utiliza el análisis de la fluorescencia del tubo con antibiótico en comparación con la fluorescencia del tubo de control de crecimiento para determinar los resultados de sensibilidad.

El instrumento **BACTEC MGIT** interpreta automáticamente estos resultados y genera un informe con un resultado de sensibilidad o resistencia.

REACTIVOS

El medio **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene 110 µL de indicador fluorescente y 7 mL de caldo para PZA. El indicador contiene cloruro pentahidratado de Tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina rutenio en una base de silicona. Los tubos están cerrados mediante un tapón de polipropileno. El pH está ajustado a 5,9.

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada:

Caldo Middlebrook 7H9 modificado . . . . . 5,9 g
Peptona de caseína . . . . . 1,25 g

El kit **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene dos frascos liofilizados de pirazinamida y seis frascos de suplemento PZA.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: pirazinamida . . . . . .20.000 µg

El suplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA contiene 15 mL de suplemento.

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada:

Albúmina bovina . . . . . .50,0 g
Dextrosa . . . . . .20,0 g
Estearato de polioxietileno (POES) . . .1,1 g
Catalasa . . . . . .0,03 g
Ácido oleico . . . . . .0,1 g

**Ajustada y/o enriquecida para satisfacer los criterios de rendimiento.*

Almacenamiento y reconstitución de los reactivos:

Medio **BACTEC MGIT** 960 PZA: tras su entrega, debe almacenarse a una temperatura de 2 °C a 25 °C. NO CONGELAR. El caldo debe estar transparente e incoloro. No utilizar si está turbio. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Si se almacenan tal como se indica, los tubos pueden inocularse hasta la fecha de caducidad.

Frascos de antibiótico **BACTEC MGIT** 960 PZA: tras su entrega, almacenar los frascos de antibiótico liofilizado a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Una vez reconstituidas, las soluciones de antibiótico pueden congelarse y almacenarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C o durante un máximo de seis meses, siempre que este período no sobrepase la fecha de caducidad original. Una vez descongeladas, las soluciones deben utilizarse inmediatamente. Desechar cualquier porción no utilizada.

Suplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA: tras su entrega, almacenar en un lugar oscuro a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Evitar su congelación y su sobrecalentamiento. Abrir y usar antes de la fecha de caducidad. Reducir al mínimo la exposición a la luz.

Instrucciones de uso:

Reconstituir cada frasco de antibiótico liofilizado **BACTEC MGIT** 960 PZA con **2,5** mL de agua estéril destilada/desionizada para obtener una solución de reserva de 8.000 µg/mL.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES: Para uso diagnóstico *in vitro*.

MUESTRA DE ANÁLISIS POTENCIALMENTE INFECCIOSA. En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"[7-10] y las directrices del centro.

El trabajo con cultivos de *M. tuberculosis* requiere procedimientos, equipo de contención e instalaciones de nivel 3 de seguridad biológica.

Lea y siga las instrucciones contenidas en los prospectos de los diferentes componentes, incluido el tubo indicador de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL.

Antes de usarlos, el usuario debe revisar los tubos y frascos en busca de indicios de contaminación o daños. Deben desecharse los tubos o frascos que no parezcan aptos. Deben examinarse detenidamente los tubos que se hayan caído. Deben desecharse los tubos que presenten daños.

En caso de que se rompa un tubo: 1) cerrar los cajones del instrumento; 2) apagar el instrumento; 3) desalojar la zona inmediatamente; 4) consultar las normas del centro o de los CDC. Un tubo inoculado que tiene pérdidas o está roto puede producir un aerosol de micobacterias; deben observarse las normas de manipulación adecuadas.

Todos los tubos **MGIT** inoculados deben ser esterilizados en autoclave antes de su eliminación.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Todas las preparaciones detalladas a continuación deben realizarse a partir de cultivos puros de *M. tuberculosis*. El laboratorio debe confirmar, mediante técnicas de identificación apropiadas, que la cepa aislada que se va a analizar sea un cultivo puro de *M. tuberculosis*.

El inóculo puede prepararse a partir de un medio sólido de un tubo **BACTEC MGIT** 7 positivo. Además, los cultivos que crecen en medios líquidos y sólidos se pueden utilizar para preparar un tubo **MGIT** de siembra que sirve para preparar el inóculo. Cada una de estas opciones se describen a continuación.

Preparación del inóculo aislado a partir de medios sólidos:

NOTA: Es importante preparar el inóculo conforme a las instrucciones presentadas a continuación para obtener la concentración apropiada del microorganismo para el análisis de sensibilidad.

1. Agregar 4 mL de caldo **BBL** Middlebrook 7H9 (o caldo **BBL MGIT**) a un tubo estéril de 16,5 x 128 mm con tapón que contenga de 8 a 10 microesferas de vidrio.
2. Con un asa esterilizada, separar el mayor número posible de colonias de un cultivo de 14 días como máximo, procurando evitar recoger medio sólido. Poner en suspensión las colonias en el caldo Middlebrook 7H9.
3. Agitar la suspensión en un agitador tipo Vortex durante 2 a 3 min para dispersar los grumos más grandes. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1.0 de McFarland.
4. Dejar que la suspensión repose durante 20 minutos sin moverla.
5. Transferir el líquido sobrenadante a otro tubo estéril de 16,5 x 128 mm con tapón (evitar transferir parte del sedimento) y dejar reposar durante otros 15 min.
6. Transferir el líquido sobrenadante (éste debe estar homogéneo, sin grumos) a un tercer tubo estéril de 16,5 x 128 mm. **NOTA:** En este paso, la suspensión del microorganismo debe ser superior al patrón 0.5 de McFarland.
7. Ajustar la suspensión a un patrón 0.5 de McFarland mediante comparación visual con el patrón de turbidez 0.5 de McFarland. No ajustar por debajo de un patrón 0.5 de McFarland.
8. Diluir 1 mL de la suspensión ajustada en 4 mL de solución salina estéril (dilución de 1:5). Utilizar la solución resultante como inóculo para AST y pasar al "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA".

Preparación del inóculo a partir de un tubo BACTEC MGIT de 7 mL positivo:

1. El primer día en que el instrumento registra un resultado positivo para un tubo **MGIT** se considera el día 0.
2. Para la preparación del inóculo de análisis, debe usarse un tubo **MGIT** de 7 mL positivo el día después de que el instrumento **BACTEC MGIT** registre por primera vez un resultado positivo (día 1) hasta el quinto día inclusive (día 5) después de que el instrumento registre el resultado positivo. Si un tubo ha permanecido positivo más de cinco días, debe hacerse un subcultivo en un nuevo tubo **MGIT** de 7 mL que contenga suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**, analizarlo en el instrumento **BACTEC MGIT** hasta que muestre positividad y utilizarlo de uno a cinco días después de mostrar positividad. Consulte "Preparación de un tubo **MGIT** de siembra a partir de medios líquidos".
3. Si el tubo es positivo los días 1 ó 2, no se requiere dilución. Utilizar la solución resultante como inóculo para AST y pasar al "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA".
4. Si el tubo es positivo los días 3, 4 ó 5, diluir 1 mL del caldo positivo en 4 mL de solución salina estéril (dilución de 1:5). Mezcle bien el tubo. Utilizar la solución resultante como inóculo para AST y pasar al "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA".

Preparación de un tubo MGIT de siembra a partir de medios líquidos

1. Mezcle el tubo por inversión o agitación vorticial.
2. Haga una dilución 1:100 añadiendo 0,1 mL del cultivo a 10 mL de caldo **BBL** Middlebrook 7H9 o caldo **BBL MGIT**. Mezclar bien.
3. Añada 0,5 mL de esta suspensión a 7 mL de tubo **MGIT** al que se han añadido 0,8 mL de suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**.
4. Cierre bien y mezcle suavemente invirtiendo 2 a 3 veces.
5. Ponga el tubo en el instrumento **BACTEC MGIT** y analice hasta obtener un resultado positivo.

   NOTA: El tiempo necesario hasta lograr la positividad debe de ser igual o superior a 4 días para su uso como inóculo AST. Si el tubo se vuelve positivo antes de que transcurran 4 días, vuelva al paso 1 y prepare un nuevo tubo de siembra.
6. Proceda a utilizar este tubo durante uno a cinco días después de la positividad. Continúe con el apartado anterior "Preparación del inóculo a partir de un tubo **BACTEC MGIT** de 7 mL positivo".

Preparación de un tubo MGIT de siembra a partir de medios sólidos

1. Con un asa de inoculación estéril retire el crecimiento del agar inclinado y añádalo a un tubo **MGIT** de 7 mL suplementado con 0,8 mL de suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**.
2. Cierre bien y mezcle suavemente invirtiendo 2 a 3 veces.

3. Ponga el tubo en el instrumento **BACTEC MGIT** y analice hasta obtener un resultado positivo.

   NOTA: El tiempo necesario hasta lograr la positividad debe de ser igual o superior a 4 días para su uso como inóculo AST. Si el tubo se vuelve positivo antes de que transcurran 4 días, vuelva al paso 1 y prepare un nuevo tubo de siembra.
4. Proceda a utilizar este tubo durante uno a cinco días después de la positividad. Continúe con el apartado anterior "Preparación del inóculo a partir de un tubo **BACTEC MGIT** de 7 mL positivo".

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: kit **BACTEC MGIT** 960 PZA que contiene dos frascos de antibiótico liofilizado y seis frascos de suplemento PZA (aproximadamente 50 análisis por kit).

Materiales necesarios no suministrados: medio **BACTEC MGIT** 960 PZA (25 tubos por caja), medios de cultivo auxiliares, reactivos, microorganismos para control de calidad y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento.

Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad BACTEC MGIT 960 PZA:

Algunas consideraciones importantes al preparar el conjunto de AST para PZA son la correcta reconstitución del antibiótico liofilizado, el uso de un cultivo puro y la correcta dilución del microorganismo para los tubos de control de crecimiento y de PZA. Es importante agregar el antibiótico únicamente al tubo **MGIT** correspondiente que tiene la etiqueta "PZA". Sólo deben utilizarse para el conjunto de AST de PZA el suplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA suministrado con el kit y los tubos de medio **BACTEC MGIT** 960 PZA.

1. Etiquetar dos tubos de medio **BACTEC MGIT** 960 PZA de 7 mL para cada cepa aislada que se vaya a analizar. Etiquetar uno como GC (control de crecimiento) y otro como PZA. Colocar los tubos en la secuencia correcta en el transportador del conjunto de AST de dos tubos (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Agregar asépticamente 0,8 mL de suplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA a cada tubo.
3. Con una micropipeta, transferir asépticamente 100 µL de la solución del antibiótico **BACTEC MGIT** PZA 8.000 µg/mL al tubo **MGIT** PZA que tiene la etiqueta correspondiente. No debe agregarse solución de antibiótico al tubo **MGIT** etiquetado como GC (control de crecimiento).

Antibiótico	Concentración del antibiótico reconstituido*	Volumen añadido a los tubos MGIT para el análisis	Concentración final en los tubos MGIT
MGIT PZA	8000 µg/mL	100 µL	100 µg/mL*

*El antibiótico PZA debe reconstituirse con **2,5** mL de agua estéril/desionizada para lograr la concentración indicada.

4. **Preparación e inoculación del tubo de control de crecimiento:** con una pipeta, transferir asépticamente 0,5 mL del inóculo para AST (véase "PREPARACIÓN DEL INÓCULO") a 4,5 mL de solución salina estéril para preparar la suspensión **1:10** de control de crecimiento. Mezclar bien la suspensión de control de crecimiento. Inocular 0,5 mL de la suspensión **1:10** de control de crecimiento en el tubo **MGIT** etiquetado como "GC".

   NOTA: Es importante utilizar una dilución **1:10** correctamente preparada para el tubo "GC" para garantizar la obtención de resultados exactos de AST y evitar errores del conjunto de AST.
5. **Inoculación de los tubos que contienen antibiótico:** con una pipeta, transferir asépticamente 0,5 mL del inóculo de AST (véase "PREPARACIÓN DEL INÓCULO") en el tubo **MGIT** etiquetado como "PZA".
6. Volver a cerrar bien los tubos. Mezclar bien los tubos invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
7. Introducir el conjunto de AST en el instrumento **BACTEC MGIT** utilizando la función de introducción del conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). Es preciso asegurarse de que el tubo de control de crecimiento esté en la primera posición de la izquierda. Seleccione PZA como antibiótico en la definición del transportador del conjunto de AST de dos tubos cuando introduzca el conjunto de AST.
8. Transferir 0,1 mL de la suspensión de microorganismos a un placa de agar de soja **Trypticase** con sangre de oveja al 5 % (TSA II). Colocar la placa dentro de una bolsa de plástico. Incubar a una temperatura de 35 °C a 37 °C.
9. Inspeccionar la placa de agar sangre a las 48 horas en busca de contaminación bacteriana. Si la placa de agar sangre no muestra crecimiento, continuar el análisis de PZA. Si la placa de agar sangre muestra crecimiento, desechar el conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**) y repetir el análisis con un cultivo puro de *Mycobacterium tuberculosis*.

Control de calidad del usuario: después de la entrega de un nuevo envío o número de lote de frascos del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA o del medio **BACTEC MGIT** 960 PZA, se recomienda analizar el microorganismo de control indicado a continuación. El microorganismo de control debe ser un cultivo puro, el cual debe prepararse conforme a las instrucciones descritas en el apartado "PREPARACIÓN DEL INÓCULO".

El conjunto de AST de control de calidad (QC) debe prepararse conforme a las instrucciones descritas en el apartado "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA". Algunas consideraciones importantes al preparar el conjunto de AST de QC son la correcta reconstitución del antibiótico liofilizado, el uso de un cultivo puro y la correcta dilución del microorganismo de QC para los tubos de control de crecimiento y de PZA. Es importante agregar el antibiótico únicamente al tubo **MGIT** correspondiente que tiene la etiqueta "PZA".

Cuando se realicen análisis de sensibilidad, deberá analizarse el mismo microorganismo de control como control de calidad de lote una vez a la semana. La observación de los resultados apropiados, mostrados a continuación, en el plazo de 4 a 20 días indica que los reactivos **BACTEC MGIT** 960 PZA están listos para usarse en el análisis de cepas aisladas de pacientes.

Si no se observan los resultados apropiados, no deben informarse los resultados del paciente. Debe repetirse el control de calidad y toda cepa aislada de pacientes afectada por el fallo inicial del control de calidad. Si el control de calidad repetido no produce los resultados esperados, no deben informarse los resultados del paciente. No utilizar el producto hasta contactar con el representante local de BD.

Cepa	GC	MGIT PZA
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensible

Durante la evaluación externa del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA, el tiempo medio hasta el resultado para el microorganismo de control fue de siete días, con un intervalo de cuatro a once días. Las causas más frecuentes de fallo del control de calidad durante la evaluación externa fue una inoculación excesiva de los conjuntos para PZA y la contaminación de los cultivos de control de calidad.

RESULTADOS

El instrumento **BACTEC MGIT** controlará los conjuntos de AST hasta que se obtenga una determinación de resistencia o sensibilidad. Una vez finalizado el análisis del conjunto, el instrumento **BACTEC MGIT** genera un informe de los resultados (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). El instrumento **BACTEC MGIT** informará el resultado de un conjunto de AST como Error (X), sin interpretación de la sensibilidad, en ciertas situaciones que podrían influir en los resultados del análisis. Las situaciones que podrían dar lugar a un resultado de Error (X) se describen en el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**, sección 7 – Resolución de problemas.

Es importante incluir el método de análisis y el nombre y la concentración del antibiótico en el informe de los resultados. Debe consultarse al especialista de Neumología o Enfermedades Infecciosas especializado en el control de la tuberculosis con respecto al tratamiento y la posología apropiados.

Es infrecuente la monorresistencia a pirazinamida, por lo que en caso de obtener resultados inesperados de resistencia, debe comprobarse la pureza y la identificación de la cepa aislada analizada como *M. tuberculosis*. La norma M24 del CLSI contiene directrices para las comprobaciones de pureza para micobacterias[2].

Informe de resultados de PZA con el sistema **BACTEC MGIT** 960

Antibiótico (concentración)	Resultado del sistema BACTEC MGIT	Informe recomendado	Acción
PZA (100 µg/mL)	Sensible	Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] con resultado de sensibilidad.	No se requiere ninguna acción.
	Resistente	Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** [PZA/100 µg/mL] con resultado de resistencia.	Si la cepa aislada es monoresistente a PZA, confirmar que la cepa aislada analizada es un cultivo puro de *Mycobacterium tuberculosis*.
	Error "X"	No generar informe.	Repetir el análisis.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA no interpreta el grado de sensibilidad de la cepa aislada analizada. Los resultados se informan como sensibilidad o resistencia.

El análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA sólo puede realizarse con un instrumento **BACTEC MGIT**. Los conjuntos de PZA no pueden leerse manualmente.

Sólo deben utilizarse cultivos puros de *M. tuberculosis*. No deben analizarse cultivos que estén contaminados o que puedan contener varias especies de micobacterias, ya que pueden producir resultados erróneos. No se recomienda el análisis directo de muestras clínicas.

Se debe permitir que las suspensiones preparadas a partir de medios sólidos reposen durante el tiempo especificado antes de realizar la estandarización. Las preparaciones de inóculos a partir de medios sólidos deben compararse visualmente con un patrón de turbidez 0.5 de McFarland; en caso contrario, pueden obtenerse resultados inexactos o puede producirse un error del conjunto de AST.

Si no se utiliza la dilución de 1:5 de la suspensión de microorganismos, en los casos en que esté indicado, para inocular los tubos que contienen el antibiótico, pueden obtenerse resultados inexactos.

Si no se utiliza una dilución de 1:10 de la suspensión de microorganismos para inocular el tubo de control de crecimiento, pueden obtenerse resultados inexactos o puede producirse un error del conjunto de AST.

Si no se reconstituye el antibiótico PZA con el volumen adecuado de agua estéril destilada/desionizada, pueden obtenerse resultados inexactos.

Es importante mezclar bien los tubos inoculados. En caso contrario, pueden obtenerse resultados falsos de resistencia.

Si no se colocan los tubos del conjunto de AST en el transportador del conjunto de AST en el orden correcto, pueden obtenerse resultados inexactos. Si no se selecciona la definición apropiada de antibióticos del transportador del conjunto de AST, pueden obtenerse resultados no válidos o inexactos.

Si no se carga correctamente el conjunto de AST en el instrumento, se originará una situación de identificación anónima que deberá resolverse en el plazo de ocho horas. Si la situación no se resuelve en ese período de tiempo, debe desecharse el conjunto de AST y comenzar de nuevo el procedimiento.

Si no se utiliza el suplemento **BACTEC MGIT** 960 PZA en el conjunto de AST para PZA, pueden obtenerse resultados inexactos. NO debe agregarse suplemento **BACTEC MGIT** 960 SIRE ni suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT** al conjunto de AST para PZA.

Si no se utiliza el medio **BACTEC MGIT** 960 PZA para el conjunto de AST para PZA, pueden obtenerse resultados inexactos. NO debe sustituirse el medio **BACTEC MGIT** 960 PZA por tubos indicadores de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL.

VALORES PREVISTOS

Se analizó un total de 118 cepas clínicas de *M. tuberculosis* con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA en cuatro centros de distinta localización geográfica. El análisis incluyó cepas aisladas subcultivadas y cepas clínicas recién aisladas a partir de cultivos líquidos y sólidos. Se realizó un total de 228 análisis de sensibilidad a PZA (cultivos líquidos y sólidos).

Durante la evaluación externa del kit **BACTEC MGIT** 960 PZA, fue necesario repetir nueve análisis de PZA de cepas clínicas debido a contaminación (seis cepas aisladas) o a inoculación excesiva o errores en el procedimiento (tres cepas aisladas).

El tiempo medio global transcurrido hasta la obtención del resultado para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA es de siete días, con un intervalo de cuatro a diecisiete días. Los datos se muestran en la Figura 1 al final del prospecto.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Estudios analíticos

Intervalos de inóculos de AST de medios líquidos y sólidos:

Medios líquidos: el procedimiento recomendado para preparar un conjunto de PZA a partir de un tubo **MGIT** de 7 mL positivo utiliza un inóculo directo los días 1 y 2 después del registro de positividad y un inóculo diluido (1:5) los días 3 a 5 después del registro de positividad. Los estudios internos muestran que los inóculos preparados a partir de un tubo **MGIT** de 7 mL positivo entre los días 1 y 5 varían entre 2,0 x 10^4 y 7,5 x 10^6 UFC/mL.

Medios sólidos: el procedimiento recomendado para preparar un conjunto de PZA a partir del crecimiento en medios sólidos (hasta 14 días después de observarse el primer crecimiento visible) utiliza una dilución de 1:5 de una suspensión de microorganismos equivalente a un patrón 0.5 de McFarland. Los estudios internos muestran que los inóculos preparados a partir de cultivos en medios sólidos varían entre 2,1 x 10^5 y 3,9 x 10^6 UFC/mL.

Reproducibilidad en lote:

La reproducibilidad en lote se evaluó utilizando 25 cepas de *M. tuberculosis* (incluidas tres cepas de ATCC). Cada cepa se analizó por triplicado con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA. Cada duplicado representaba una situación de análisis distinta diferenciada por lote de antibiótico PZA, por suplemento PZA y por medio PZA utilizado (tres lotes cada uno).

Se compararon los resultados observados con los resultados previstos. La reproducibilidad global del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA es del 96,8 %.

Análisis del panel de referencia de los CDC:

El rendimiento del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA se evaluó por medio de un panel de cepas aisladas de referencia obtenido de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, EE.UU. El panel estaba constituido por nueve cepas de *M. tuberculosis* con patrones de sensibilidad conocidos (por medio del sistema **BACTEC** 460TB). El panel se analizó por triplicado con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA. Se compararon los resultados del análisis **BACTEC MGIT** 960 PZA con los resultados previstos conforme a los CDC. La coincidencia global con los resultados previstos conforme a los CDC para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA es del 98,7 %.

Evaluación clínica

El análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA se evaluó en cuatro centros clínicos de distinta localización geográfica, que incluían centros regionales de referencia y laboratorios de hospitales universitarios, incluidos dos centros de fuera de Estados Unidos. Se comparó el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA con el método de análisis de la sensibilidad **BACTEC** 460TB PZA.

Análisis de la reproducibilidad:

La reproducibilidad del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA se evaluó en los centros clínicos utilizando un panel de cinco cepas validadas. Se compararon los resultados del análisis **BACTEC MGIT** 960 PZA con los resultados previstos. La reproducibilidad global del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA es del 94 %.

Análisis del panel de referencia de los CDC:

El rendimiento del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA se evaluó en los cuatro centros clínicos por medio de un panel de cepas aisladas de referencia obtenido de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, EE.UU. El panel estaba constituido por nueve cepas de *M. tuberculosis* con patrones de sensibilidad conocidos (por medio del sistema **BACTEC** 460TB). De los 36 resultados de PZA obtenidos con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA, 33 concordaron con los resultados previstos conforme a los CDC. El porcentaje de concordancia calculado con respecto a los resultados previstos conforme a los CDC para el análisis **BACTEC MGIT** 960 PZA es del 91,7 %.

Análisis de cepas clínicas:

Se analizó un total de 118 cepas clínicas de *M. tuberculosis* con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 PZA y el análisis de sensibilidad **BACTEC** 460TB PZA. El análisis incluyó cepas aisladas subcultivadas y cepas clínicas recién aisladas a partir de cultivos líquidos y sólidos. Se generó un total de 228 resultados de análisis.

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis de cepas clínicas para el antibiótico PZA en una concentración de 100 µg/mL en cultivos líquidos, en cultivos sólidos y en ambos tipos de cultivo combinados.

Tabla 1. Resultados de cepas clínicas: análisis de sensibilidad BACTEC MGIT 960 PZA en comparación con el análisis de sensibilidad BACTEC 460TB

		Sistema BACTEC 460TB		Sistema BACTEC MGIT 960			
		Resultados de PZA previstos		Resultados de sensibilidad		Resultados de resistencia	
Cultivo	**N.º de análisis**	**S**	**R**	**N.º de concordancias**	**Categoría de porcentaje de concordancia (IC 95 %)**	**N.º de concordancias**	**Categoría de porcentaje de concordancia (IC 95 %)**
LÍQUIDOS	112	89	23	88	98,9% (93,9–100)	22	95,7% (78,1–99,9)
SÓLIDOS	113*	90	23	88	97,8% (92,2–99,7)	20	87,0% (66,4–97,2)
TOTAL	225*	179	46	176	98,3% (95,2–99,7)	42	91,3% (79,2–97,6)

*En esta tabla no se incluyen tres resultados inciertos con el sistema **BACTEC** 460TB.

Todas las cepas aisladas con resultados discordantes en el análisis **BACTEC MGIT** 960 PZA se analizaron con el análisis de sensibilidad **BACTEC** 460TB PZA en dos centros independientes. Los resultados discordantes correspondían a cepas cuyo resultado en el análisis **BACTEC MGIT** 960 PZA era diferente al resultado del análisis **BACTEC** 460TB PZA. En los cálculos para el kit **BACTEC MGIT** 960 PZA no se incluyen los resultados inciertos (B, borderline).

De las cuatro cepas aisladas sensibles a PZA con resultados discordantes (S-**BACTEC MGIT** 960, R-**BACTEC** 460TB), una tuvo un resultado de sensibilidad en ambos centros independientes y las otras tres tuvieron resultados de resistencia en ambos centros. Las tres cepas resistentes a PZA con resultados discordantes (R-**BACTEC MGIT** 960, S-**BACTEC** 460TB) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros independientes.

Dos de las tres cepas con resultados de PZA inciertos en el análisis **BACTEC** 460TB (S-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros independientes. Una de las tres cepas con resultados de PZA inciertos en el análisis **BACTEC** 460TB (R-**BACTEC MGIT** 960, B-**BACTEC** 460TB) tuvo un resultado de sensibilidad en uno de los centros independientes. El resultado en el otro centro independiente fue incierto.

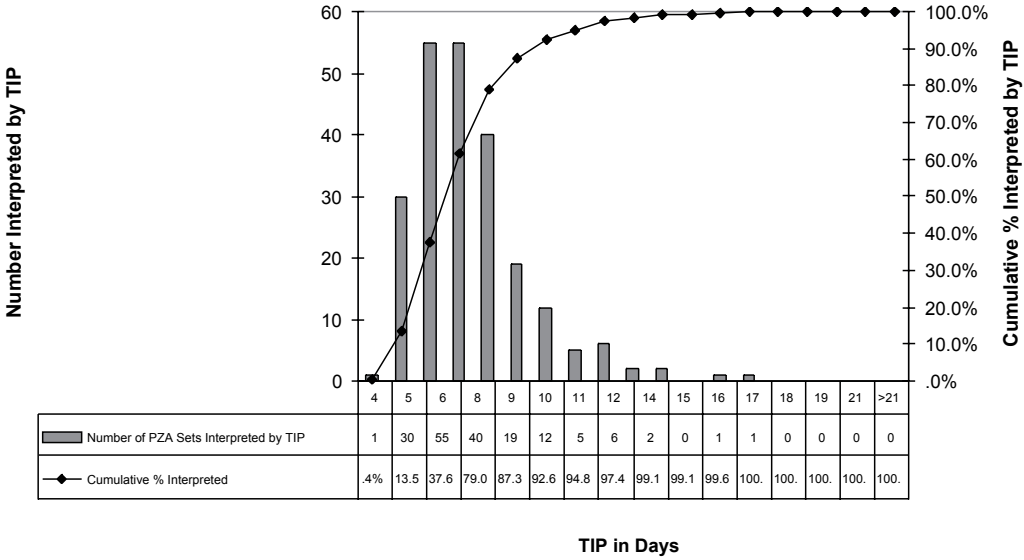
PRESENTACIÓN

Nº ref.	**Descripción**
245128	Kit **BACTEC MGIT** 960 PZA, caja con 2 frascos de antibiótico liofilizado y 6 frascos de suplemento PZA.
245115	Medio **BACTEC MGIT** 960 PZA, caja de 25 tubos.

REFERENCIAS

Véase la sección “References” en el texto inglés.

Frequency Distribution of PZA Time in Protocol (TIP)



TIP in Days	4	5	6	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	21	>21
Number of PZA Sets Interpreted by TIP	1	30	55	40	19	12	5	6	2	0	1	1	0	0	0	0
Cumulative % Interpreted	.4%	13.5	37.6	79.0	87.3	92.6	94.8	97.4	99.1	99.1	99.6	100.	100.	100.	100.	100.

Figure 1: Distribution of **BACTEC MGIT** 960 PZA AST Time to Result / Figure 1 : Distribution du temps dans le résultat **BACTEC MGIT** 960 AST PZA / Abbildung 1: Verteilung der **BACTEC MGIT** 960 PZA-AST-Testdauer bis zum Erhalt eines Ergebnisses / Figura 1 - Distribuzione del tempo per ottenere il risultato con il **BACTEC MGIT** 960 PZA AST / Figura 1: Distribuição do período de tempo até à obtenção do resultado do AST com o sistema **BACTEC MGIT** 960 PZA / Figura 1. Distribución del tiempo transcurrido hasta la obtención del resultado con el sistema de AST **BACTEC MGIT** 960 PZA

Frequency Distribution of PZA Time in Protocol (TIP) / Distribution de fréquence du temps PZA dans le protocole (TDP) / Häufigkeitsverteilung der PZA-Testdauer im Protokoll (TDP) / Frequenza di distribuzione della durata del protocollo PZA (TIP) / Distribuição da frequência do Tempo de Permanência no Protocolo (TIP) do PZA / Distribución de frecuencias del tiempo de análisis (TA) de PZA

Number Interpreted by TIP / Nombre interprété par TDP / Anzahl der Interpretationen nach TDP / Numero interpretato mediante TIP / Número interpretado por TIP / Número interpretado por TA

Cumulative % Interpreted by TIP / % cumulatif interprété par TDP / Kumulativer Prozentsatz der Interpretationen nach TDP / % cumulativa interpretata mediante TIP / Percentagem cumulativa interpretada por TIP / Porcentaje acumulado interpretado por TA

Number of PZA Sets Interpreted by TIP / Nombre de modules PZA interprétés par TDP / Anzahl interpretierter PZA-Ansätze nach TDP / Numero di set PZA interpretati mediante TIP / Número de conjuntos de PZA interpretados por TIP / Número de conjuntos de PZA interpretados por TA

Cumulative % Interpreted / % cumulatif interprété / Kumulativer Interpretationsprozentsatz / % cumulativa interpretata / Percentagem cumulativa interpretada / Porcentaje acumulado interpretado

Do not reuse / Nepoužívejte opakovaně / Må ikke genbruges / Niet opnieuw gebruiken / Mitte kasutada korduvalt / Ei saa käyttää uudelleen / Usage unique / Nicht wiederverwenden / Μην το ξαναχρησιμοποιείτε / Egyszer használatos / Non riutilizzare / Tik vienkartiniam naudojimui / Må ikke gjenbrukes / Nie stosować powtórnie / Não reutilizar / Nepoužívajte opakovane / No reusar / Får ej återanvändas / Не използвайте отново / A nu se reutiliza / Tekrar kullanmayın / Ne upotrebljavajte ponovo / Не использовать повторно / Пайдаланбаңыз / Ne koristiti ponovo

Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač / Производитель / Атқарушы

Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Използвайте до / A se utiliza până la / Son kullanma tarihi / Upotrebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do /
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af måned) /
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä)
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mėnesio pabaiga)
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutten av måneden)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiaca)
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârşitul lunii) /
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /
ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)

Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Каталожен номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі

Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselet az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU

In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaite / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisas / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diyagnostik Tıbbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku

Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegränsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura

Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargenummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)

Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contémo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Conţine suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Достаточно для <n> тестов(а) / <n> тесттері үшін жеткілікті / Sadržaj za (n) testova

Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οσηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultaţi instrucţiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu

Keep away from light / Nevystavujte světlu / Må ikke udsættes for lys / Weghoudvan licht / Hoida eemal valgusest / Suojattava valolta / Conserver à l'abri de la lumière / Vor Licht schützen / Φυλάξτε το μακριά από φως / Fény nem érheti / Tenere al riparo dalla luce / Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / Må ikke utsettes for lys / Przechowywać z dala od źródeł światła / Manter ao abrigo da luz / Uchovávajte mimo dosahu svetla / Mantener alejado de la luz / Får ej utsättas för ljus / Пазете от светлина / A se feri de lumină / Işıktan uzak tutun / Držite dalje od svetlosti / Хранить в темноте / Қараңғыланған жерде ұста / Držati dalje od svjetla

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 U.S.A.
800-638-8663
www.bd.com/ds

EC REP Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, BACTEC, BBL, MGIT, and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company © 2009 BD